

# PRODUCTION OF HEMATOPOIETIC STEM CELL

**Publication number:** JP10295369 (A)

**Publication date:** 1998-11-10

**Inventor(s):** TSUJI TAKASHI; WATABE YOSHIHIRO; WAGA IWAO +

**Applicant(s):** JAPAN TOBACCO INC +

**Classification:**

- international: **A61K35/14; A61K35/28; A61K35/39; A61K35/407; A61K35/50; A61P35/02; A61P7/00; C12M3/00; C12N5/00; C12N5/07; C12N5/0789; C12R1/91; A61K35/14; A61K35/28; A61K35/37; A61K35/48; A61P35/00; A61P7/00; C12M3/00; C12N5/00; C12N5/07; C12N5/0789; (IPC1-7): A61K35/14; A61K35/28; A61K35/39; A61K35/407; A61K35/50; C12M3/00; C12N5/06; C12N5/06; C12R1/91**

- European:

**Application number:** JP19970352216 19971204

**Priority number(s):** JP19970352216 19971204; JP19970059951 19970226

**Abstract of JP 10295369 (A)**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To readily and efficiently produce CD34-positive cells excellent in safety and useful for treatment of acute leukemia, tumorous disease, etc., in a short time in a high yield, by culturing human CD34-positive cells in a nutrient medium containing stroma cells derived from a mammal. **SOLUTION:** Human CD34-positive cells such as human CD34-strongly positive cells derived from umbilical cord blood, spinal fluid, liver, spleen and peripheral blood is cultured in a nutrient medium having abilities capable of propagating human CD34-positive cells, derived from a mammal such as mouse, containing stroma cells such as HESS-1 and HESS-5 (FERM BP-5768), and preferably containing cytokine such as interleukin-3 and hepatic cell factor to propagate the human CD34-positive cells and to provide the human CD34-positive cells in the method for producing the human CD34-positive cells.

Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-295369

(43) 公開日 平成10年(1998)11月10日

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> 識別記号

F I

C 1 2 N 5/06

C 1 2 N 5/06

E

A 6 1 K 35/14

A B Y

A 6 1 K 35/14

A B Y Z

A D V

35/28

A D V

35/39

35/39

35/407

35/407

審査請求 未請求 請求項の数23 F D (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-352216

(71) 出願人 000004569

(22) 出願日 平成9年(1997)12月4日

日本たばこ産業株式会社  
東京都港区虎ノ門二丁目2番1号

(31) 優先権主張番号 特願平9-59951

(72) 発明者 辻 孝

(32) 優先日 平9(1997)2月26日

神奈川県横浜市金沢区福清1-13-2 日  
本たばこ産業株式会社医薬探索研究所内

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(72) 発明者 渡部 良広  
神奈川県横浜市金沢区福清1-13-2 日  
本たばこ産業株式会社医薬探索研究所内(72) 発明者 和賀 巖  
神奈川県横浜市金沢区福清1-13-2 日  
本たばこ産業株式会社医薬探索研究所内

(74) 代理人 弁理士 大東 厚雄

(54) 【発明の名称】 造血幹細胞の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 臍帯血等から取得されるCD34陽性細胞、特にCD34強陽性CD38弱陽性(またはCD38陰性)造血幹細胞を、短期間のインビトロ培養で、簡便に大量に増殖、製造する方法、並びに該製造方法に適した細胞培養器具を開発する。

【解決手段】 ヒト臍帯血から単離したCD34陽性細胞を、IL-3及びSCF等のサイトカインの存在下で、哺乳動物のストローマ細胞と約10日間共培養することにより、ソースとして用いた臍帯血由来CD34陽性細胞と同一の特性を有する多分化能を有するCD34陽性造血幹細胞を大量に製造することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトのCD34陽性細胞を、ヒトのCD34陽性細胞を増殖させる能力を有する哺乳動物由来のストローマ細胞を含む栄養培地中で培養することにより該ヒトのCD34陽性細胞を増殖させることを特徴とするヒトのCD34陽性細胞の製造方法。

【請求項2】 培養により製造されるCD34陽性細胞が、CD34強陽性細胞であることを特徴とする請求項1に記載の製造方法。

【請求項3】 CD34陽性細胞が、脾静脈、骨髓、肝臓、脾臓又は末梢血に由来するCD34陽性細胞であることを特徴とする請求項1または請求項2に記載の製造方法。

【請求項4】 ストローマ細胞が、マウス由来のストローマ細胞または該ストローマ細胞を含むマウスの組織であることを特徴とする請求項1乃至請求項3のいずれかに記載の製造方法。

【請求項5】 ストローマ細胞が、HESS-1、HESS-5（国際寄託番号：FERM BP-5768）、HESS-18（国際寄託番号：FERM BP-6187）、HESS-M28（国際寄託番号：FERM BP-6186）、SSXL CL.1、SSXL CL.3、SSXL CL.7、SSXL CL.9及びSSXL CL.17と各々命名されたマウス由来のストローマ細胞からなる群から選ばれる1種又は2種以上のストローマ細胞であることを特徴とする請求項4に記載の製造方法。

【請求項6】 ストローマ細胞が、HESS-6（国際寄託番号：FERM BP-6768）、HESS-18（国際寄託番号：FERM BP-6187）、HESS-M28（国際寄託番号：FERM BP-6186）及びSSXL CL.3と各々命名されたマウス由来のストローマ細胞からなる群から選ばれるストローマ細胞であることを特徴とする請求項4に記載の製造方法。

【請求項7】 培養を、サイトカインの存在下で行うことを特徴とする請求項1乃至請求項6のいずれかに記載の製造方法。

【請求項8】 サイトカインが、インターロイキン-3、幹細胞因子（SCF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、f1k2/f1t3-リガンド、マクロファージ由来炎症性タンパク1α（MIP-1α）及びエリスロポエチン（EPO）からなる群から選ばれる1種または2種以上のサイトカインであることを特徴とする請求項7に記載の製造方法。

【請求項9】 CD34陽性細胞が、ストローマ細胞と接触状態、非接触状態または間接接触状態で培養されることを特徴とする請求項1乃至請求項8のいずれかに記載の製造方法。

【請求項10】 CD34陽性細胞が、ストローマ細胞と間接接触状態で培養されることを特徴とする請求項1乃至請求項8のいずれかに記載の製造方法。

【請求項11】 請求項1乃至請求項10のいずれかに記載の製造方法によって得られるヒトのCD34陽性細胞。

【請求項12】 請求項1乃至請求項10のいずれかに記載の製造方法によって得られるヒトのCD34陽性細胞と薬学的に許容され得る担体とからなる医薬組成物。

【請求項13】 国際寄託番号FERM BP-6187で識別されるマウス由来のストローマ細胞株。

【請求項14】 国際寄託番号FERM BP-6186で識別されるマウス由来のストローマ細胞株。

【請求項15】 培養容器と該培養容器内に保持された細胞を支持するための少なくとも1つの支持体からなる培養器具であって、該支持体はCD34陽性細胞又はストローマ細胞の少なくとも一方を培地中に播種支持するための支持膜と該支持膜を容器に固定するための支持具からなることを特徴とするCD34陽性細胞を増殖培養するための培養器具。

【請求項16】 細胞を培養するための器具であって、少なくとも下記の部材から構成されることを特徴とする器具：

(a) 栄養培地及びサイトカインを透過させることができ、細胞を通過させることができない第1の膜；

(b) 該第1の膜の上面側に配備され、二酸化炭素を透過させることができ、液体を透過させることができない第2の膜（ここで、該2つの膜は、下記（d）の管が配備されることによる開口部を除き、該2つの膜の間に、該器具の外に液体が漏出しないような内容積を有する連繋系が形成されるように配備される。）；

(c) 該第1の膜の下面側に配備され、二酸化炭素を透過させることができ、液体を透過させることができない第3の膜（ここで、該2つの膜は、下記（e）の管が配備されることによる開口部を除き、該2つの膜の間に、該器具の外に液体が漏出しないような内容積を有する連繋系が形成されるように配備される。）；

(d) 該第1の膜と第2の膜との間に配備され、液体、栄養培地及び細胞を注入または排出させることができる第1の管；及び

(e) 該第1の膜と第3の膜との間に配備され、液体、栄養培地及び細胞を注入または排出させることができる第2の管。

【請求項17】 第1の膜と第2の膜との間、または第1の膜と第3の膜との間に形成される内容積を有する連繋系のいずれかが、該2つの膜の一方を不溶性の枠の片面に配備し、また他方の膜を該枠の他面に配備することにより形成されることを特徴とする請求項16に記載の器具。

【請求項18】 第1の膜と第2の膜との間及び第1の膜と第3の膜との間に形成される内容積を有する連繋系の各々に栄養培地を含んでおり、かつ第1の膜のいずれか一方の面に細胞が接着していることを特徴とする請求項16または請求項17に記載の器具。

【請求項19】 細胞が、哺乳動物のストローマ細胞であることを特徴とする請求項18に記載の器具。

【請求項20】 第1の膜と第2の膜との間、または第1の膜と第3の膜との間に形成される内容積を有する遮蔽系のいずれかに、哺乳動物のストローマ細胞が含まれていることを特徴とする請求項16または請求項17に記載の器具。

【請求項21】 ストローマ細胞が、ヒトのCD34陽性細胞を増殖させる能力を有するストローマ細胞であることを特徴とする請求項19または請求項20に記載の器具。

【請求項22】 ストローマ細胞が、HESS-5 (国際寄託番号: FERM BP-6768)、HESS-18 (国際寄託番号: FERM BP-6187)、HESS-M28 (国際寄託番号: FERMP-6186) 及びSSXL CL 3と各々命名されたマウス由来のストローマ細胞株からなる群から選ばれたストローマ細胞であることを特徴とする請求項21に記載の器具。

【請求項23】 請求項15乃至請求項22のいずれかに記載の器具を用いることを特徴とするヒトのCD34陽性細胞の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ヒトのCD34陽性細胞の製造方法、細胞培養器具、並びに該培養器具を用いたヒトCD34陽性細胞の製造方法に関する。さらに詳しくは、ストローマ細胞との共存下、各種サイトカインを含有若しくは非含有栄養培地中で、多能性幹細胞及び/又はHPP-CFCを含むCD34陽性細胞を増殖させ、製造する方法、並びに該製造に用いる細胞培養器具に関する。

【0002】

【従来の技術】 血液中には、生体機能を司る血球細胞として酸素運搬に関わる赤血球系、血小板を産生する巨核球系、感染防御に関わる顆粒球、単球/マクロファージなどの骨髄球系、免疫を担当するT細胞・B細胞などのリンパ球系の各細胞系列がある。血球細胞のいずれの細胞も、共通の起源である多能性造血幹細胞より分化・成熟することにより、一生を通じて維持・産生されている。多能性造血幹細胞は、リンパ球、赤血球、血小板等の機能細胞に分化し得る多能性と、そのような多能性を維持したまま自己増殖する能力 (自己複製能) を兼ね備えており、造血制御機構によって多能性造血幹細胞が枯渇しないように自己複製を行うと共に、各種血球細胞に分化・成熟していく。これまでの多くの研究から、多能性造血幹細胞が各種血球細胞へ分化する過程は多段階の分化決定によって各血球系への分化が方向づけられており、図1のようにまとめられている。

【0003】 多能性造血幹細胞は、まず骨髄球系及びリンパ球系の2系列へ方向づけられ、それぞれ骨髄系幹細胞 (CFU-GEMM) 及びリンパ系幹細胞へ分化し、さらに骨髄系幹細胞はBFU-E、CFU-Eを経て赤血球系、CFC-MEGを経て好中球系、BO-CFCを経て好酸球系、CFU-GMを経て単球・好中球・好塩基球となり、またリンパ系幹細胞

はT前駆細胞を経てT細胞に、B前駆細胞を経てB細胞になる。骨髄系幹細胞及びこれらから派生する各種前駆細胞の特定方法については、各種サイトカインの存在下における半流動性培地中でできるコロニーの性状によってこれらの細胞を特定するいわゆるコロニー形成法が知られている。この方法によって、骨髄系幹細胞である顆粒球・赤血球系・単球系・巨核球系コロニー形成細胞 (CFU-GEMM) 及び前駆細胞である顆粒球・マクロファージコロニー形成細胞 (CFU-GM)、赤血球系コロニー形成細胞 (BFU-E)、巨核球コロニー形成細胞 (CFU-MEG)、好酸球コロニー形成細胞 (BO-CFC) 等の骨髄系の前駆細胞を特定することが可能である (Exp. Hematol., 11, 721, 1983)。一方、多能性造血幹細胞やリンパ系幹細胞、骨髄系幹細胞等のいわゆる造血幹細胞は、主として骨髄、脾臓血などに存在し、さらに末梢血中にも存在することが明らかにされている (Blood, 87, 3082-3088, 1996)。多くの研究者がこれら造血幹細胞の実体を明らかにするために均一の細胞として生体から分離する試みが行われているものの、現在もお成りしていない。多能性造血幹細胞とは、放射線照射によって造血幹細胞を含む血球細胞を完全に死滅させた個体に移植したときに、その個体で産生されるべきすべての血球細胞系列を再び構築できる「造血再構築能」をもつことが必須の条件であるといわれている。ヒトにおいて、生体外でコロニーを形成する前駆細胞が、細胞表面抗原であるCD34分子を発現している細胞集団に濃縮されることから (Blood, 75, 1941, 1990)、Berensonらは血球細胞死滅処理したがん患者へCD34陽性細胞の移植を試みたところ造血系の再構築が認められ、造血再構築能を有する多能性造血幹細胞はCD34陽性細胞の集団に含まれることが臨床的にも認められるようになった (Blood, 77, 1717, 1991)。しかしながらCD34陽性細胞は、造血幹細胞以外の前駆細胞をも含んでいるため、さらに亜集団に分離する試みがなされた。その結果、造血幹細胞はCD34陽性CD38陰性の細胞集団に最も多く含まれると考えられることが示された (Blood, 77, 1218-1227, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8707-8711, 1993, Blood, 83, 1516-1526, 1994)。また、上記コロニー形成法に従ってマウスの血球を解析した結果、高増殖性コロニー形成細胞 (HPP-CFC) が、造血再構築能とよく相関していることから、これらHPP-CFCは多能性造血幹細胞と非常に関連していることが判明した (Exp. Hematol., 10, 26-35, 1982)。最近になってヒトでも同様の細胞が明らかにされ、これがCFU-GEMMより幼稚な前駆細胞であることが示された (Blood, 74, 609, 1989)。HPP-CFCは、細胞表面マーカーでみるとCD34<sup>+</sup>細胞集団に濃縮され、非常に幼稚であることが明らかにされた (Blood, 81, 41-48, 1993)。またHPP-CFCは、CD34陽性CD38陰性の細胞集団に濃縮されることから (Blood, 83, 3170-3181, 1994)、HPP-CFCは生体外において造血幹細胞を評価する良い指標といえ

る。

【0004】造血再構築能を有する細胞である多能性造血幹細胞をはじめとするいわゆる造血幹細胞は、主として骨髓中に多く存在することが知られており、骨髓移植治療をおこなうことによって、一生にわたり各種血球細胞を産生する造血幹細胞を提供者（ドナー）から受容者（レシピエント）の骨髓に定着させ、血液に関連する各種疾患を根治できるのではないかと考えられた。初期には実験的治療法であったものの、現在では確立された治療法となった（Jpn. J. Pediatr. Hematol., 8, 492, 1994）。現在では、急性白血病をはじめとする腫瘍性血液疾患や、重症免疫不全、アデノシンデアミナーゼ欠損症、再生不良性貧血等の疾患に対し、骨髓移植治療が施されている。さらに、これら造血幹細胞が少量ながら末梢血にも存在することが明らかにされたこと、コロニー刺激因子製剤（CSF）を投与して造血幹細胞を含む末梢血を用いた移植も普及しつつある（J. Hematother., 2, 513, 1993, Lancet, 341, 1482, 1993）。この方法は、骨髓移植が大量の骨髓細胞を必要とするためドナーの心身への負担が大きいものに対して、ドナーに対して心身への負担が軽減され、また白血球や血小板の回復が早いという利点がある。また最近になって、臍帯血が骨髓と同程度の造血幹細胞を含むことが明らかにされ、移植治療に有用であることが明らかにされた（New England J. Med., 335, 157, 1996）。臍帯血は、骨髓や末梢血と比べて重症の急性移植片対宿主病（GVHD）の発生率が低く、その有用性が期待されている。しかしながら臍帯血の場合、採取量の少なさが問題とされ、1個体由来する臍帯血では体重40kg程度までのレシピエントにのみ移植可能であると考えられている（Blood, 87, 3082, 1996）。移植では、ドナー由来のT細胞の混入によるGVHDの発症や、自己移植の際のがん細胞の混入による再発が問題となる（Lancet, 341, 85, 1993）。一方、造血幹細胞は、CD34陽性、特にCD34強陽性細胞の細胞集団として濃縮でき、しかも不要な細胞を除去できる可能性から（Hematol. Oncol. Ann., 2, 78, 1994）、今日ではCD34陽性幹細胞移植が行われるようになった（Blood, 77, 1717, 1991, J. Clin. Oncol., 12, 28, 1994）。このような進歩にもとまって、移植治療の確実性を高め、より効率的な実施を行なうべく、数多くのドナーに由来する造血幹細胞バンクの整備が急務となりつつある（Transplant. Proc., 24, 3032-3034, 1992）。同時に、このような造血幹細胞を効率的に増幅する試みが行われている（Blood, 87, 3082-3088, 1996）。また、幼稚な造血幹細胞を多く含む臍帯血についても同様に移植応用への期待が高まっているものの、前述のとおり採取量が少ないことから、造血幹細胞を増幅するシステムが期待されている（Blood, 87, 3082-3088, 1996）。このように造血幹細胞を安定かつ確実に入手できるシステムの構築は、移植以外に治療法のない前記難治性血液疾患の患者

にとっては生命にかかわる問題であり、社会的にも重要な課題であるといえる。

【0005】多能性造血幹細胞をはじめとする造血幹細胞及びこれら造血幹細胞から派生する各種前駆細胞は、CD34陽性細胞集団に含まれていることが明らかにされているため、分離、濃縮するのに好適であり、増幅のための出発材料として利用されている（Blood, 87, 3082-3088, 1996）。これらCD34陽性細胞は、骨髓や臍帯血の血液細胞中に1から2%存在している。CD34陽性細胞の分離は、細胞表面のCD34分子を認識する抗体と反応性を有する陽性細胞を回収することが基本原理である。CD34抗体をビオチンや磁気ビーズで標識し、分離したい細胞群と反応させ、その後それぞれアビジンビーズや磁気でCD34陽性細胞を回収する方法や、CD34抗体をコートした培養器具に細胞を入れ、CD34抗体と反応しない細胞を除去した後、CD34陽性細胞を回収する方法がよく使用されており、いずれの方法であっても質的に差のないCD34陽性細胞が回収できる（Hematother., 2, 333, 1993, Exp. Hematol., 21, 585, 1993）。臨床では、磁気標識したCD34抗体と磁石を利用した機器が開発され、日本でも医薬審議会において希少疾患治療器具として認定されている。CD34陽性細胞の増幅は、一般に液体培養にて行われるが、個々の造血幹細胞や前駆細胞に対する特異的増殖因子が明らかにされていないために、それぞれの血球細胞に作用する各種サイトカインの組み合わせが用いられ、おり、これまでに多くの報告がなされている（Blood, 83, 1717, 1996）。サイトカインの組み合わせによるCD34陽性細胞の増幅では、培養後の全血球細胞数は増加するものの、培養中に分化が誘導促進され、結果的に最終分化したCD34陰性の血球細胞が増加する一方、増幅の源となったCD34陽性細胞自体はほとんど枯渇してしまう傾向があることが知られている（Blood, 87, 3082-3088, 1996）。これまでに報告されたCD34陽性細胞の増幅においては、前駆細胞であるCFU-GMの増幅が指標にされていることが多い。例えばHaylockらは、末梢血CD34陽性細胞をインターロイキン1β（IL-1β）、およびIL-3、IL-6、顆粒球マクロファージコロニー形成因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー形成因子（G-CSF）、幹細胞因子（SCF）の存在下で14日間培養して、CFU-GMを20-60倍に増幅したと報告している（Blood, 80, 1405, 1992）。またCD34陽性細胞をIL-3、IL-6、SCF、G-CSF、GM-CSFの存在下で7日間培養してCFU-GMを57倍増幅したとの報告もある（Blood, 82, 3600-3609, 1993）。また骨髓系幹細胞であるCFU-GEMMの増幅の報告もされており、Bruggerらは末梢血CD34陽性細胞をIL-1β、IL-3、IL-6、インターフェロンγ（IFNγ）、エリスロポエチン（EPO）で12日間培養し、CFU-GEMMを250倍に増幅した（Blood, 81, 2579-2584, 1993）。またSCFおよびIL-6、可溶性IL-6レセプター（sIL-6R）での培養によってもCFU-GEMMの増幅は可能との報告もある（W096/15230号公

報)。以上の報告では、特定の細胞系列への方向づけが既に決定された前駆細胞であるCFU-GMや、造血幹細胞ではあるものの既に分化がおきた骨髄系幹細胞 (CFU-GEM) を対象としているため、造血再構築能を有する造血幹細胞の増幅に言い難いものであった。そのため、CFU-GEMよりも多能性造血幹細胞により近い細胞の同定法として、長期培養を可能にさせる細胞 (LTC-IC) を検出する評価法を用いた解析が試みられたが、ごくわずかに増幅するか維持されるだけで、CFU-GMのように著しい増幅は認められなかった (Blood, 81, 661, 1993, Blood, 75, 2118, 1990, Blood, 81, 2579, 1993, Blood, 84, 2898, 1994)。またLTC-ICと並んでCFU-GEMより未熟な細胞を検出する別の評価法として前述のHPP-CFCが知られている。HPP-CFCの増幅では、Sroufらが骨髄CD34陽性HLA-DR陰性CD15陰性ロダミン123弱陽性細胞集団にHPP-CFC及びLTC-ICが濃縮されることを見出し (Blood, 79, 634, 1992, Cytometry, 12, 179, 1991)、この細胞をSCF及びIL-3とGM-CSFの融合蛋白質 (PIX321 で 4 週間培養するとHPP-CFCが5.5倍増幅することを報告している (Blood, 81, 661-669, 1993)。しかしながら、培養期間が長い上に、増幅倍率が低いのが難点であった。さらにLaらは、CD34陽性細胞集団中に約20%の割合で含まれるCD34<sup>+</sup>細胞にHPP-CFCが濃縮されることを見出し (Blood, 81, 41-48, 1993)、この細胞をIL-1 $\alpha$ 、SCF、IL-3存在下で培養するとHPP-CFCが7日間で160倍に増幅できることを報告した (Blood Cells, 20, 456-467, 1994)。この増幅法では出発材料が、通常のCD34陽性細胞よりもより5倍程度濃縮が進んだ段階にあるため、他の増幅法よりも見かけ上の増幅倍率が5倍高く評価されているものと考えられる。また培養14日目では、HPP-CFCが80分の1まで急激に低下してしまう難点があり、取り扱いも容易でない。そのためCD34陽性細胞を濃縮する必要がある、かつ簡便に安定した増幅が可能な方法が移植等の臨床上で使用に有用であろうと考えられる。

【0006】一方、CD34陽性細胞の増幅方法として、ヒト骨髄由来のストローマ細胞を株化し、この上で造血幹細胞・前駆細胞の維持・増殖させる方法が試みられている (Exp. Hematol., 22, 482-487 (1994))。しかし、この方法ではCD34陽性細胞が分化していくために幼弱な幹細胞自体はほとんど増殖しないか、むしろ最初の時点より減少したため、移植してもやがては血球細胞が枯渇するおそれがあり移植のための技術としては不適合である。また別法として、ストローマ細胞との接触がなくともストローマから産生される液性因子のみで培養することにより、増幅することができるとの報告もある (国際特許出願公開第93/20184号公報)。しかし、この方法においても造血幹細胞は分化するのみで自己増殖しないために上記方法と同様の理由で移植のための技術としては不適合である。また特開平7-504331号公報には、ある

種の間質細胞と白血病阻害因子 (LIF) を必須のサイトカインとして用い、その他の数種のサイトカインとの共存下でのCD34陽性細胞の増幅が認められる旨の記載がある。しかしながら、培養期間が数週間と長期であり、臨床で使用して行くには困難であると考えられている。また、CD34陽性細胞の増幅について細胞の絶対数で評価した例も報告されている。例えば、Satoらは、IL-3、IL-6、SCF、GM-CSF、GM-CSFの存在下で末梢血CD34陽性細胞を培養すると、CD34陽性CD33陽性細胞が約300倍増幅可能であったと報告している (Blood, 82, 3600-3609, 1993)。この報告におけるCD34分子の発現の強度 (量) を見ると、CD34弱陽性であり、CD34陰性の細胞集団と重なる領域をも含んでいるため、純粋にCD34陽性細胞の絶対数の評価とは言いがたい。またSroufらは、骨髄CD34陽性HLA-DR陰性CD15陰性ロダミン123弱陽性細胞集団をSCF及びPIX321で7日間培養するとCD34陽性細胞集団として2.9倍増幅することを報告した (Blood, 81, 661-669, 1993) が、増幅倍率としては低いものであった。前述のように、CD34陽性の細胞集団のなかで、HPP-CFCをはじめとする幼弱な幹細胞は、CD34強陽性細胞であることから見ると、少なくとも絶対数における造血再構築能評価ではCD34強陽性細胞を指標とすることが好ましいといえる。

#### 【0007】

【発明が解決しようとする課題】以上述べてきたように、造血再構築能を有する多能性造血幹細胞をはじめとするCD34陽性細胞の増幅は、増幅を行う過程における分化をいかに抑制してCD34陽性細胞自体の増幅をいかに可能にするかが大きな課題となっている。また生体外で簡便に、かつできる限り短い培養期間で、安定して増幅できる培養法の開発が待たれていた。本発明で使用するストローマ細胞株は、マウス骨髄及び脾臓に由来する細胞であり、これら細胞株のなかでも、特にHES5-5と命名された細胞株はマウス骨髄前駆細胞の増殖を誘導し、培養条件によって骨髄系及びBリンパ球系の長期培養を支持する優れたストローマ細胞株であることが報告されている (Leukemia, 10, 803-812, 1996)。本願発明では、この細胞株、及び他の細胞株をヒトCD34陽性細胞の増幅に応用したものである。HES5-5細胞株や他のマウスストローマ細胞株がヒトの造血幹細胞を含めたCD34陽性細胞に及ぼす作用を及ぼすのかという効果に関しては、これまでに知見がなく、本願発明において初めて明らかになった。

#### 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意検討した結果、CD34陽性細胞である造血幹細胞をストローマ細胞との共存下において、換置すればある種のストローマ細胞が存在すれば造血幹細胞を顕著に増殖させることができ、必要に応じて栄養培地中にサイトカインを混合させると、CD34陽性細胞で

ある造血幹細胞及び/又はHPP-CFCを含む造血幹細胞をさらに増殖させることを見出し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明によれば造血幹細胞は、ある種のストローマ細胞の共存下において増殖することができる。換言すれば、ある種のストローマ細胞を存在させることにより造血幹細胞を増殖させることができ、必要に応じて1種または2種以上のサイトカインを培養培地中に混合させることにより、造血幹細胞はさらに自己複製させることができる。また、造血幹細胞より若干分化段階の進んだ骨髄系前駆細胞群についても同様に増殖を誘導する。さらに本発明によれば、培養法の原理を具現化した培養器具を用いて、造血幹細胞を必要な数だけ自己複製させ、極めて容易に増殖した細胞を採取することができる。なお、CD34陽性細胞としてはこれらの細胞に特に限定される訳ではないが、特にCD34陽性細胞が好ましく、また純粋な血液細胞のみならずこのような細胞を含む組織であってもよい。

【0009】即ち、本願発明は、下記のとおりのものである。

(1) ヒトのCD34陽性細胞を、ヒトのCD34陽性細胞を増殖させる能力を有する哺乳動物由来のストローマ細胞を含む培養培地中で培養することにより該ヒトのCD34陽性細胞を増殖させることを特徴とするヒトのCD34陽性細胞の製造方法。

(2) 培養により製造されるCD34陽性細胞が、CD34陽性細胞であることを特徴とする前記(1)に記載の製造方法。

(3) CD34陽性細胞が、脾臓、骨髄、肝臓、脾臓又は末梢血に由来するCD34陽性細胞であることを特徴とする前記(1)または前記(2)に記載の製造方法。

(4) ストローマ細胞が、マウス由来のストローマ細胞または該ストローマ細胞を含むマウスの組織であることを特徴とする前記(1)乃至前記(3)のいずれかに記載の製造方法。

(5) ストローマ細胞が、HESS-1、HESS-6 (国際寄託番号: FERM BP-6768)、HESS-18 (国際寄託番号: FERM BP-6187)、HESS-M28 (国際寄託番号: FERM BP-6186)、SXL CL.1、SXL CL.3、SXL CL.7、SXL CL.9及びSXL CL.17と各々命名されたマウス由来のストローマ細胞からなる群から選ばれる1種又は2種以上のストローマ細胞であることを特徴とする前記(4)に記載の製造方法。

(6) ストローマ細胞が、HESS-5 (国際寄託番号: FERM BP-6768)、HESS-18 (国際寄託番号: FERM BP-6187)、HESS-M28 (国際寄託番号: FERM BP-6186) 及びSXL CL.3と各々命名されたマウス由来のストローマ細胞からなる群から選ばれるストローマ細胞であることを特徴とする前記(4)に記載の製造方法。

(7) 培養を、サイトカインの存在下で行うことを特徴とする前記(1)乃至前記(6)のいずれかに記載の製造方法。

(8) サイトカインが、インターロイキン-3、幹細胞因子(SCF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、f1k2/f1k3-リガンド、マクロファージ由来炎症性タンパク1 $\alpha$ (MIP-1 $\alpha$ )及びエリスロポエチン(EPO)からなる群から選ばれる1種または2種以上のサイトカインであることを特徴とする前記(7)に記載の製造方法。

(9) CD34陽性細胞が、ストローマ細胞と接触状態、非接触状態または間接接触状態で培養されることを特徴とする前記(1)乃至前記(8)のいずれかに記載の製造方法。

(10) CD34陽性細胞が、ストローマ細胞と間接接触状態で培養されることを特徴とする前記(1)乃至前記(8)のいずれかに記載の製造方法。

(11) 前記(1)乃至前記(10)のいずれかに記載の製造方法によって得られるヒトのCD34陽性細胞。

(12) 前記(1)乃至前記(10)のいずれかに記載の製造方法によって得られるヒトのCD34陽性細胞と薬学的に許容され得る担体とからなる医薬組成物。

(13) 国際寄託番号FERM BP-6187で識別されるマウス由来のストローマ細胞株。

(14) 国際寄託番号FERM BP-6186で識別されるマウス由来のストローマ細胞株。

(15) 培養容器と該培養容器内に保持された細胞を支持するための少なくとも1つの支持体からなる培養器具であって、該支持体はCD34陽性細胞又はストローマ細胞の少なくとも一方を培地中に播種支持するための支持膜と該支持膜を容器に固定させるための支持具からなることを特徴とするCD34陽性細胞を増殖培養するための培養器具。

(16) 細胞を培養するための器具であって、少なくとも下記の部材から構成されることを特徴とする器具:

(a) 培養培地及びサイトカインを透過させることができ、細胞を通過させることができない第1の膜;

(b) 該第1の膜の上面側に配備され、二酸化炭素を透過させることができ、液体を透過させることができない第2の膜(ここで、該2つの膜は、下記(d)の管が配備されることによる開口部を除き、該2つの膜の間に、該器具の外に液体が漏出ししないような内容積を有する遮蔽系が形成されるように配備される。);

(c) 該第1の膜の下面側に配備され、二酸化炭素を透過させることができ、液体を透過させることができない第3の膜(ここで、該2つの膜は、下記(e)の管が配備されることによる開口部を除き、該2つの膜の間に、該器具の外に液体が漏出ししないような内容積を有する遮蔽系が形成されるように配備される。);

(d) 該第1の膜と第2の膜との間に配備され、液体、培養培地及び細胞を注入または排出させることができる第1の管; 及び

(e) 該第1の膜と第3の膜との間に配備され、液体、

栄養培地及び細胞を注入または排出させることができる第2の管。

(17) 第1の膜と第2の膜との間、または第1の膜と第3の膜との間に形成される内容積を有する遮蔽系のいずれかが、該2つの膜の一方を不溶性の種の面に配備し、また他方の膜を該種の他の面に配備することにより形成されることを特徴とする前記(16)に記載の器具。

(18) 第1の膜と第2の膜との間及び第1の膜と第3の膜との間に形成される内容積を有する遮蔽系の各々に栄養培地を含んでおり、かつ第1の膜のいずれか一方の面に細胞が接着していることを特徴とする前記(16)または前記(17)に記載の器具。

(19) 細胞が、哺乳動物のストローマ細胞であることを特徴とする前記(18)に記載の器具。

(20) 第1の膜と第2の膜との間、または第1の膜と第3の膜との間に形成される内容積を有する遮蔽系のいずれかに、哺乳動物のストローマ細胞が含まれていることを特徴とする前記(16)または前記(17)に記載の器具。

(21) ストローマ細胞が、ヒトのCD34陽性細胞を増殖させる能力を有するストローマ細胞であることを特徴とする前記(19)または前記(20)に記載の器具。

(22) ストローマ細胞が、HESS-6 (国際寄託番号: FERM BP-5768) 、HESS-18 (国際寄託番号: FERM BP-6187) 、HESS-M28 (国際寄託番号: FERM BP-6186) 及びUSX3 L、CL-3と各々命名されたマウス由来のストローマ細胞株からなる群から選ばれたストローマ細胞であることを特徴とする前記(21)に記載の器具。

(23) 前記(15)乃至前記(22)のいずれかに記載の器具を用いることを特徴とするヒトのCD34陽性細胞の製造方法。

#### [0010]

【発明の実施の形態】ここで、本発明に用いられる「造血幹細胞」とは、あらゆる種類の血球に分化する能力を有するとともに造血再構築能力を有する細胞であり、主に骨髓、臍帯血、脾臓あるいは肝臓中に存在し、微量ながら末梢血にも存在する。これら造血幹細胞は、CD34強陽性細胞であり、本発明においては高増殖能コロニー形成細胞 (High-Proliferative Potential Colony-Forming Cells (HPP-CFC)) もこれに含まれる。「幹細胞」とは、多能性造血幹細胞及びこれらから分化したリンパ球系幹細胞、骨髄系幹細胞 (CFU-GEMM) を意味する。これらはCD34陽性細胞である。

[0011] 「前駆細胞」とは、多能性造血幹細胞から各系統の血液細胞が分化形態学的には同定できないがすでに赤血球系など一方の血液細胞にしか分化し得ない細胞を意味する。具体的には血小球コロニー形成細胞 (CFC-MEG)、好酸球コロニー形成細胞 (BO-CFC)、顆粒球単球コロニー形成細胞 (CFU-GM)、赤血球形成細胞

(BFU-E、CFU-E)、T前駆細胞、B前駆細胞などである。これらはいずれもCD34陽性細胞である。

[0012] 「機能細胞」とは、血球細胞としての機能を有する細胞を意味する。具体的には赤血球、血小板、好酸球、単球、好中球、好酸球、T細胞、B細胞などである。

[0013] 「分化抗原表現型」とは、哺乳動物の細胞表面上、好ましくはヒト血球細胞上に存在する分化抗原の表現型を意味する。通常、この種の抗原はCDの番号をもって分類される。CDはcluster of differentiationの略で、モノクローナル抗体によって認識される抗原のいかたまり (cluster) を意味する。具体的にはCD34、CD4、CD8、CD10、CD13、CD19、CD33、CD38などを挙げるることができる。他にもThy-1、HLA-DRなどを挙げることもできる。

[0014] 「細胞系」とは、初代培養以後の培養細胞をすべて指し、初代培養に存在した細胞または細胞群からの一連の系統を意味する。この培養細胞は初代細胞と共存していてもよいし、互いに触れ合っている状態で存在してもよいし、あるいは水、電解質などの液体、培地、培養液等の媒介物を介した状態で存在してもよい。

[0015] 「組織」とは、特定方向に分化し、同一の機能、形態をもつ細胞集団をいう。ストローマ細胞を含む組織としては、具体的には骨髓、脾臓などを挙げることもできる。

[0016] 「CD34陽性細胞」とは、抗原表現型の一つであるCD34を発現している細胞を意味し、具体的には多能性造血幹細胞、HPP-CFC等の造血幹細胞、リンパ球系幹細胞、骨髄系幹細胞等の幹細胞、T前駆細胞、B前駆細胞、BFU-E、CFU-E、CFU-MEG、BO-CFC、CFU-GM等の前駆細胞がこれに該当する。

[0017] 「CD34強陽性細胞」とは、抗原表現型の一つであるCD34を特に強く発現している細胞を意味し、具体的には高増殖能コロニー形成細胞 (High-Proliferative Potential Colony-Forming Cells (HPP-CFC)) または多能性造血幹細胞それ自体、またはこれら細胞をより多く含んでいるCD34陽性細胞群を意味する。

[0018] 「CD34陰性細胞」とは、抗原表現型の一つであるCD34を発現していない機能細胞を意味し、具体的にはT細胞を含むT前駆細胞以後のT細胞系の細胞、B細胞を含むB前駆細胞以後のB細胞系の細胞、赤血球を含むCFU-E以後の赤血球系の細胞、血小板を含むCFC-MEG以後の血小板系の細胞、好酸球を含むBO-CFC以後の好酸球系の細胞または単球、好中球もしくは好塩基球を含むCFU-GM以後の単球、好中球もしくは好塩基球系の細胞である。本願において使用される、上述のようない「陽性」、「強陽性」、「弱陽性」及び「陰性」なる用語は、場合によっては、各々単に「+」(プラス)、「high+」、「low」及び「-」(マイナス)と表記される。例えば、「CD34<sup>low</sup> CD38<sup>low</sup>」とは、CD34を強



く発現しており(強陽性)、かつCD38を弱く発現しているか若しくは発現していない(弱陽性または陰性)ことを意味する。

【0019】「ストローマ細胞」とは、骨髓、脾臓などに由来する基質細胞または間質細胞を指し、本願発明においては、ヒトのCD34陽性細胞を増殖する能力を有するストローマ細胞であれば、どのようなストローマ細胞も用いることができる。例えば、HESS-1、HESS-5(国際寄託番号:FERM BP-5768)、HESS-18(国際寄託番号:FERM BP-6187)、HESS-M28(国際寄託番号:FERM BP-6186)、SSXL CL.1、SSXL CL.3、SSXL CL.7、SSXL CL.9及びSSXL CL.17と各々命名されたマウス由来のストローマ細胞が例示される。好ましくは、HESS-5(国際寄託番号:FERM BP-5768)、HESS-18(国際寄託番号:FERM BP-6187)、HESS-M28(国際寄託番号:FERM BP-6186)、またはSSXL CL.3であり、特に好ましくは、HESS-5(国際寄託番号:FERM BP-5768)、HESS-18(国際寄託番号:FERM BP-6187)、HESS-M28(国際寄託番号:FERM BP-6186)である。

【0020】「培養細胞株」とは、生体の組織、臓器などに由来する細胞で、生体外で培養することにより無限増殖能力を獲得することによって、生体外に継代培養することが可能となった細胞である。一般に、単一の細胞に由来する株が作られ、これを細胞株と呼ばれる。培養細胞株には線維芽細胞株、上皮細胞株などが知られている。

【0021】「非接触状態」とは、所望の細胞と第2の細胞が培地中で距離を隔てて別々に存在し、互いに直接的に触れ合っていない状態を示す。

【0022】「接触状態」とは、所望の細胞と第2の細胞、具体的には造血幹細胞等のCD34陽性細胞とストローマ細胞が、任意に集まって存在している状態であり、この場合培地(培養液)中に所望の細胞と第2の細胞が懸濁している状態、整然と層状に並んでいる状態、一方の細胞間他方の細胞が陥り込んだ状態のいずれの状態であってもよい。

【0023】「間接接触状態」とは、所望の細胞と第2の細胞、具体的にはCD34陽性細胞とストローマ細胞が微孔性の支持膜を介してその表面側と裏面側にそれぞれ隔てて層状に存在する状態をいう。

【0024】「栄養培地」とは、天然培地、半合成培地、合成培地、固形培地、半固形培地、液体培地などが挙げられるが、前述に定義されるCD34陽性細胞を、自己を含めた増殖、分化、成熟または保存させるために用いられるものであり、通常、細胞増殖に用いられるようなものであれば如何なる培地であってもよい。例を挙げると、たとえば $\alpha$ -MEM培地、RPMI-1640培地またはMEM基本培地などが挙げることができ、基本成分としてナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、リン、塩素、アミノ酸、ビタミン、ホルモン、抗生物質、脂肪

酸、糖または目的に応じてその他の化学成分もしくは血清のような生体成分を含有することもできる。

【0025】「支持体」とは、CD34陽性細胞及び/又はストローマ細胞を培養容器中に支持するためのものであり、下記のごとき「支持膜」と「支持具」から構成される。特に好ましくはシルクハット形状をしたセルカルチャーインサートと呼ばれるものである。

【0026】「支持膜」とは、所望の細胞と第2の細胞、具体的にはCD34陽性細胞とストローマ細胞を隔てるために使用される部材である。支持膜としては微孔性のものが好ましく、このときの孔の大きさは所望の細胞と第2の細胞、具体的にはストローマ細胞とCD34陽性細胞の両者とも通過できない大きさの孔であることが好ましい。具体的には、水、ナトリウムイオンや塩素イオンなどの電解質などが通過でき、タンパク質、ホルモンなどが通過できないセロハンのような膜であってもよいし、水、ナトリウムイオンや塩素イオンなどの電解質、タンパク質、ホルモンなどが通過できるフィルム状の又は多孔性の膜であってもよい。好ましくは水、ナトリウムイオンや塩素イオンなどの電解質、サイトカイン等のタンパク質、ホルモンなどの高分子が通過でき、両方の細胞または一方の細胞の一部が突起状に突き出すことができる多孔性の膜が好ましい。

【0027】また、膜の素材はストローマ細胞が維持・生存でき、CD34陽性細胞が維持・生存・分化・成熟・自己複製するのに何ら阻害するものでなければ如何なる素材であってもよい。素材としては具体的にはポリエチレンテトラフルート、ポリカーボネートなどが挙げられる。さらに、膜は形状が一定しないで変化する任意の形状であってもよいし、形状の一定しているものであってもよい。具体的には平面状、波状の他、半球状、箱状のような一部が開放されている形状、球形、チューブ状または形状が一定しないで変化する任意の形状であってもよい。このとき、球形などの閉鎖系(密閉系)の膜の場合は膜の内部に所望の細胞を入れ、膜の外側に第2の細胞を入れるか、または逆に膜の内部に第2の細胞を入れ、膜の外側に所望の細胞を入れればよい。また膜の裏面は如何なるものであってもよい。また、微孔性支持体の例としては、網状、織布状、不織布状、紙状あるいは微孔性を穿孔してなる微小孔板等を挙げることができる。

【0028】「支持具」とは、これら「支持膜」を培養容器に固定するための部材であり、必要により様々なものを使用することができる。具体的には支持体を培養容器に釣り下げるための吊具、容器壁に固定することができる棚状に固定するための支持片、あるいは支持膜をその上に載置するための支持台等を挙げることができる。(詳しくは図2乃至図4を参照)。

【0029】本願発明で用いられる「共存」なる用語は、所望の細胞と第2の細胞、具体的にはCD34陽性細胞とストローマ細胞が一つの培地(培養液)中で任意の状

態で存在している状態をいい、前述のような接触状態、非接触状態及び間接的接触状態を包含するものである。但し、後述の実施例においては、特に断りがない限り接触状態を意味する。

【0030】「固定又は接着」とは、ある物質が他の物質に常に接触し、一カ所に定まって相互に移動しない状態を示す。具体的にはある播種された細胞（具体的な細胞としてはCD34陽性細胞またはストローマ細胞）が前記に示した支持膜に常に接触している状態をいい、該細胞は該支持膜に常に接触し、一カ所に定まって移動しない状態であってもよいし、該細胞は該膜に常に接触しながら移動している状態であってもよい。

【0031】「サイトカイン」とは、細胞から放出され、細胞間相互作用を媒介するタンパク質性因子で、免疫応答の制御作用、抗腫瘍作用、抗ウイルス作用、細胞増殖・分化の調節作用などを示す物質であって、具体的にはインターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-3 (IL-3)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-5 (IL-5)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-7 (IL-7)、インターロイキン-8 (IL-8)、インターロイキン-9 (IL-9)、インターロイキン-10 (IL-10)、インターロイキン-11 (IL-11)、インターロイキン-12 (IL-12)、インターロイキン-13 (IL-13)、インターロイキン-14 (IL-14)、インターロイキン-15 (IL-15)、インターロイキン-16 (IL-16)、インターフェロン $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )、インターフェロン $\beta$  (IFN- $\beta$ )、インターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球-単球コロニー刺激因子 (GM-CSF)、単球コロニー刺激因子、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子、好酸球コロニー刺激因子、血小板コロニー刺激因子、幹細胞因子 (SCF)、幹細胞増殖因子、f1k2/f1t3-リガンド、白血病阻害 (阻止) 因子、エリスロポエチン (EPO)、マクロファージ由来炎症性タンパク1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) などが挙げられ、好ましくはインターロイキン-3、幹細胞因子 (SCF)、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子、f1k2/f1t3-リガンド、MIP-1 $\alpha$  またはエリスロポエチンなどが挙げられる。

【0032】「凍結保存剤」とは、凍害防止剤、凍害防御物質ともいう。生物細胞、具体的にはストローマ細胞またはCD34陽性細胞を凍結状態に生きたまま保存する場合の凍害を軽減する目的で培地 (培養液) 中に加える物質を意味する。具体的にはグリセリン、エチレングリコール、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ショ糖、グルコース、ポリビニルピロリドン (PVP) などである。

【0033】「培養容器」とは、所望の細胞、具体的には造血幹細胞等のCD34陽性細胞を増殖させるときに用いる容器のことであり、ストローマ細胞が維持・生存でき、CD34陽性細胞が維持・生存・分化・成熟・自己複製

するものに何ら阻害するものでなければ如何なる素材、形状のものを用いてもよい。具体的には培養容器の素材としてはガラス、合成樹脂、天然樹脂、金属、プラスチックなどが挙げられ、形状としては具体的には三角柱、立方体、直方体などの多角柱、三角錐、四角錐などの多角錐、ひょうたんのような任意の形状、球形、半球形、円柱 (底面が円形、楕円形または半円形等を含む) などを挙げることができ、また例えば半球形から球形のように培養中に必要に応じて形状を変化させてもよい。培養は開放条件下であってもよいし、閉鎖 (密閉) 条件下であってもよい。

【0034】「コロニー」とは、固型培地で1個の細胞から出発してできた可視的な集塊をいう。

【0035】「分化」とは、ここではCDによって表される表面抗原分子が変化して、次の段階の細胞になることをいう。具体的には多能性幹細胞 (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) からリンパ系幹細胞 (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) または骨髄系幹細胞 (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD33<sup>-</sup>) のように分化抗原の表現型が変化するをいい、リンパ系幹細胞からT前駆細胞またはB前駆細胞、骨髄系幹細胞からBFU-E、CFU-G、CFU-MEG、Eo-CFCまたはCFU-GM、BFU-EからCFU-E、T前駆細胞からT細胞、B前駆細胞からB細胞、CFU-Eから赤血球、CFU-MEGから血小板、Eo-CFCから好酸球、CFU-GMから単球、好中球または好塩基球になることをいい (CDについては図1を参照)。

【0036】本願の発明の一つである上述の (16) の発明における「第1の膜」としては、少なくとも細胞を培養、維持するための栄養増地及びサイトカイン等の蛋白を透過することができ、細胞を通過させることができないような性質を有するような膜であればどのような膜も使用可能である。具体的には、多数の微孔を有する膜が好ましく、孔の大きさは培養する細胞を通過させることができず、一方で水や培養液等の液体、ナトリウムイオンや塩素イオンなどの電解質、上述のようなサイトカイン (所望に応じ、脂質や糖など) を透過するような膜である。さらに、別の態様としては、水や培養液等の液体、ナトリウムイオンや塩素イオンなどの電解質、上述のようなサイトカイン (所望に応じ、脂質や糖など) を透過でき、該微孔を通じて細胞の一部が突起状に突き出すことができる膜が挙げられる。具体的一例としては、0.1~0.6 $\mu$ m (マイクロメートル)、好ましくは、0.4~0.5 $\mu$ mの微孔が挙げられる。該膜の微孔の数は、は、膜の強度が保たれる限りできるだけ多い方が好ましく、例えば5~20孔/cm、好ましくは約10孔/cmを挙げることができる。また、膜の素材としては、細胞が維持・生存でき、細胞の維持・生存、分化、成熟、及び/または複製を阻害するものでなければ如何なる素材であってもよい。具体的にはポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネートなどが挙げられる。さらに、膜は形状が一定しないで変化する任意の形状であってもよいし、形状の一定しているものであってもよい。本願の発

明の一つである上述の(16)の発明における「第2の膜」及び「第3の膜」としては、少なくとも二酸化炭素を透過することができ、液体を透過させることができないような性質を有するような膜であればどのような膜も使用可能である。即ち、前記第1の膜と第2の膜との間、及び/または該第1の膜と第3の膜との間に形成される内容積を有する遮断系中において細胞を培養するために必要な二酸化炭素を透過でき、該遮断系内に添加される栄養培養液等の液体が、該遮断系の外(器具の外)に漏出しないようにすることができる膜を指す。本願の発明の一つである上述の(16)の発明における「管」は、前記第1の膜と第2の膜との間、及び/または該第1の膜と第3の膜との間に形成される内容積を有する遮断系中に、培養液等の液体及び細胞を注入し、また該遮断系から培養液等の液体及び細胞を排出させるために配備される。該管としては、該遮断系中に、培養液等の液体及び細胞を注入し、また該遮断系から培養液等の液体及び細胞を排出させることができるようなものであればどのようなものでも使用でき、例えば、シリコンチューブを挙げることができる。該少なくとも2層の遮断系の各々は、栄養増培が充填されるが、いずれの系においても空気を含まない状態(栄養増培で完全に満たされており、気相が存在しない状態)が好ましいことから、各々の遮断系に含まれる空気は、該管を通じて排出することができる。本願の(16)発明の器具には、図33に例示されるような構成を有する器具が含まれる。本願における細胞培養は、常法に従って、例えば下記のように実施することができる。培養容器中に、必要に応じてナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、リン、塩素、アミノ酸、ビタミン、ホルモン、抗生物質、脂肪酸、糖または目的に応じてその他の化学成分もしくは血清のような生体成分を含有した $\alpha$ -MEM増培、RPMI-1640増培またはMEM基本増培などの栄養増培中、ストローマ細胞の存在下、必要に応じて5ng/ml乃至200ng/ml、好ましくは10ng/ml乃至100ng/mlの濃度のインターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-3 (IL-3)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-5 (IL-5)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-7 (IL-7)、インターロイキン-8 (IL-8)、インターロイキン-9 (IL-9)、インターロイキン-10 (IL-10)、インターロイキン-11 (IL-11)、インターロイキン-12 (IL-12)、インターロイキン-13 (IL-13)、インターロイキン-14 (IL-14)、インターロイキン-15 (IL-15)、インターロイキン-16 (IL-16)、インターフェロン $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )、インターフェロン $\beta$  (IFN- $\beta$ )、インターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球-単核コロニー刺激因子 (GM-CSF)、単核コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、好酸球コロニー刺激因子、血小板コロ

ニ-刺激因子、幹細胞因子 (SCF)、幹細胞増殖因子、f1k2/flt3-リガンド、白血病症阻(阻)因子、エリスロポエチン(EPO)、マクロファージ由来炎症性タンパク1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ )などのサイトカインの存在下、CD34陽性細胞を播種し、30℃乃至40℃、好ましくは37℃で5日間乃至30日間、好ましくは10日間乃至25日間培養することにより、CD34陽性細胞を増殖させることができる。

【0037】培養中におけるストローマ細胞とCD34陽性細胞の配置の具体的な例示としては間接培養法、非接触培養法、間接接触培養法が挙げられ、以下に具体的に培養方法を記載する。第1に本願図面の図2の例示のように、ストローマ細胞と造血幹細胞等のCD34陽性細胞を培養液中で直接接触させ、培養する方法である。培養中はストローマ細胞とCD34陽性細胞は互いに上下左右の任意に層状に直接接触することができる。CD34陽性細胞はストローマ細胞とストローマ細胞の間に潜り込んだりすることもできる。逆にストローマ細胞はCD34陽性細胞とCD34陽性細胞の間に潜り込んだりすることもできる。

【0038】第2に本願図面の図3(a)乃至(d)に例示するように、ストローマ細胞とCD34陽性細胞を各種支持具で容器に固定した支持膜で隔て、互いの細胞が接触していない状態、即ち非接触状態での培養方法である。図3(a)支持体は、支持膜と支持具と一体に形成されたシルクハット形状のものである。図3(b)のものにはさらに支持膜を増して2層としたものである。では下の膜は培養容器の中で培養液(増培)を二つする上に設置し、上の膜が支持具で支えられていてもよく、上の膜と下の膜が両方とも培養液(増培)を分ける状態つまり培養容器中の培養液(増培)が2枚の膜で三分割されているように設置してもよい。この場合は膜の支持具はあってもなくてもよい。また、支持具の素材はストローマ細胞が維持・生存でき、CD34陽性細胞が維持・生存・分化・成熟・自己複製するものに何ら阻害するものではないければ如何なる素材であってもよい。素材としては具体的にはガラス、合成樹脂、天然樹脂または金属などが挙げられる。また、図2(c)は支持膜を容器中に翻転して吊り下げた場合を示し、図2(d)は支持膜を容器底面に設けた支持具で下から支えた場合を示すものである。図3(a)は1枚の膜で隔てられており、図3(b)は2枚の膜で隔てられている。また図3(b)の上の膜の支持板と下の膜の支持板は同一の支持板であってもよいし、それぞれ別の支持板であってもよい。さらに、図3(a)及び(b)においてはストローマ細胞とCD34陽性細胞が入替わった状態であってもよい。図3(a)及び(b)の両方ともに、膜は平面のみであってもよい。膜の支持板部を膜にし、平面を水やナトリウムイオンや塩素イオンなどの電解質通さない物質にしたもの、平面及び膜の支持板部を膜にしたもののいずれの場合であってもよい。さらに膜は必要に応じて支持板を取り付け、球形、チューブ状または互いの細胞が接触しない限り任

意の形状を有していてもよく、膜の中側にCD34陽性細胞を入れ、膜の外側にストローマ細胞を入れることもできる。逆に膜の中側にストローマ細胞を入れ、外側にCD34陽性細胞を入れることもできる。

【0039】第3に図4(a)、(b)及び(c)の例示のように、所望の細胞(具体的にはCD34陽性細胞)と第2の細胞(具体的にはストローマ細胞)を支持膜を介して間接接触状態で培養する方法である。支持膜は支持具で支えられ、互いの細胞が膜を通過し混じり合うことはないが、両者が互いに膜を隔てて最も近傍に位置する状態で培養する方法である。図4(a)における支持具は図3の場合と同様、シルクハット形状のものが好ましく用いられる。図4(a)は1枚の膜で隔てられており、図4(b)は2枚の膜で隔てられている。図4

(b)は一方の膜に第2の細胞(具体的にはストローマ細胞)と所望の細胞(具体的にはCD34陽性細胞)の両細胞が接合し、互いの細胞に接触できる状態であり、他方の膜には第2の細胞(具体的にはストローマ細胞)のみが接合している状態である。図4(c)は所望の細胞(具体的にはCD34陽性細胞)が2枚の膜にはさまれ、両方の膜に接触するように置かれている。所望の細胞(具体的にはCD34陽性細胞)が接触している2枚の膜の反対の面に第2の細胞(具体的にはストローマ細胞)を接触させたものである。図4(c)の状態は、ストローマ細胞中にCD34陽性細胞が潜り込んだ状態に類似している。

図4(a)、(b)及び(c)においては所望の細胞(具体的にはCD34陽性細胞)と第2の細胞(具体的にはストローマ細胞)が入り替わった状態であってもよい。図4(a)、(b)及び(c)のいずれも、膜は平面のみであってもよい。膜の支持板部を膜にし、平面を水やナトリウムイオンや塩素イオンなどの電解質通さない物質にしたもの、平面及び膜の支持板部を膜にしたもののいずれの場合であってもよい。さらに必要に応じて支持板を取り付け、球形、チューブ状または互いの細胞が接触しない限り任意の形状を有して膜の中側に所望の細胞(具体的にはCD34陽性細胞)を入れ、膜の外側に第2の細胞(具体的にはストローマ細胞)を入れることもできる。逆に膜の中側に第2の細胞(具体的にはストローマ細胞)を入れ、外側に所望の細胞(具体的にはCD34陽性細胞)を入れることもできる。

【0040】第2及び第3の培養方法で用いる支持膜は1または2乃至無数の微孔がある膜が好ましく、このときの孔の大きさは所望の細胞と第2の細胞、具体的にはストローマ細胞とCD34陽性細胞の両方とも通過できない大きさの孔でなければならない。具体的には、水、ナトリウムイオンや塩素イオンなどの電解質などが通過でき、脂肪酸、糖、タンパク質、ホルモンなどの高分子が通過できないセパンのような膜であってもよい。水、ナトリウムイオンや塩素イオンなどの電解質、脂肪酸、糖、タンパク質、ホルモンなどの高分子が通過でき

る膜であってもよい。好ましくは、水、ナトリウムイオンや塩素イオンなどの電解質、脂肪酸、糖、サイトカイン等のタンパク質、ホルモンなどは通過でき、両方の細胞または一方の細胞の一部が突起状に突き出すことができる膜が好ましい。また、膜の素材はストローマ細胞が維持・生存でき、CD34陽性細胞が維持・生存・分化・成熟・自己複製するのに何ら阻害するものでなければ如何なる素材であってもよい。素材としては具体的にはポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネートなどが挙げられる。さらに、膜は形状が一定しないて変化する任意の形状であってもよいし、形状の一定しているものであってもよい。具体的には平面状、半球形、水槽のような一部が開放されている形状、球形、チューブ状または形状が一定しないて変化する任意の形状でもよい。このとき、球形などの閉鎖系(密閉系)の膜の場合は膜の内部に所望の細胞を入れ、膜の外側に第2の細胞を入れるか、または逆に膜の内部に第2の細胞を入れ、膜の外側に所望の細胞を入れるべきよい。また膜の厚さは如何なるものであってもよい。膜は必要に応じて支持具を用いてもよい。このときの支持具としてはストローマ細胞が維持・生存でき、CD34陽性細胞が維持・生存・分化・成熟・自己複製するのに何ら阻害するものでなければ如何なる素材・形状のものを用いてもよい。支持台の素材としては具体的にはガラス、合成樹脂、天然樹脂または金属などが挙げられる。

【0041】所望の細胞(具体的にはCD34陽性細胞)を移植するにあたって、第2の細胞(具体的にはストローマ細胞)とが互いに異種動物である場合や同種の動物の場合であっても別の個体や株化した細胞を用いる場合には増殖後のレシエンツの生体内で免疫反応が起こる可能性があるため、ストローマ細胞とCD34陽性細胞を分離し、CD34陽性細胞のみを移植に用いることが好ましい。第2または第3の培養方法を用いれば、ストローマ細胞とCD34陽性細胞が互いに別の個体または異種動物の場合、例えばストローマ細胞がマウス由来の細胞でCD34陽性細胞がヒト由来の細胞である場合でも互いの細胞の分離・精製が極めて容易に行うことができ、CD34陽性細胞である造血幹細胞の移植が素早くしかも安全に行うことができる。

【0042】第1、第2及び第3の培養方法のいずれの培養についても培養するにおいて、適切な培養容器で行うことができる。培養容器はストローマ細胞が維持・生存でき、CD34陽性細胞が維持・生存・分化・成熟・自己複製するのに何ら阻害するものでなければ如何なる素材、形状のものを用いてもよい。具体的には培養容器の素材としてはガラス、合成樹脂、天然樹脂、金属などが挙げられ、形状としては具体的には三角柱、立方体、直方体などの多角柱・三角錐、四角錐などの多角錐、ひょうたんのような任意の形状、球形、半球形、円形、楕円形、半円形などが挙げられる。培養は開放条件下であっ

てもよいし、閉鎖（密閉）条件下であってもよい。培養液（培地）については、ストローマ細胞が維持・生存でき、CD34陽性細胞が維持・生存・分化・成熟・自己複製するのに何ら阻害するものでなければ如何なる培養液（培地）を用いることができる。培養するにあたり、温度、浸透圧、光などの物理的環境条件、酸素、炭酸ガス、pH、酸化還元電位などの化学的環境条件としてはストローマ細胞が維持・生存でき、CD34陽性細胞が維持・生存・分化・成熟・自己複製するのに何ら阻害するものでなければ如何なる環境条件であってもよい。温度については具体的には、30℃乃至40℃であり、好ましくは37℃である。浸透圧については具体的には生理条件における浸透圧であり、好ましくは生理食塩水と等しい浸透圧である。光としては暗室ほどの暗い条件であってもよいし、晴天時の外の明るさほどに明るくてもよい。酸素濃度としては具体的には培養系が気相中の酸素濃度が10%の気相と接触している状態での溶解酸素濃度乃至気相中の酸素濃度が30%の気相と接触している状態での酸素濃度であってもよく、好ましくは気相中の酸素濃度が20%の気相と接触している状態での溶解酸素濃度の気相と接触している状態での酸素濃度である。培養系において一般的にpHをコントロールするためのpHとして具体的にはpH6.0乃至pH8.0であり、好ましくは生理条件と同等のpHである。pHをコントロールする為には二酸化炭素を用いてもよいし、他のいかなる緩衝液を用いてもよい。炭酸ガスの濃度としては具体的には培養系が5%の気相と接触している状態での溶解炭酸ガス濃度である。

【0043】さらに、培養容器中の培地（培養液）には、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、リン、塩素などの無機物、アミノ酸、ビタミン、ホルモン、抗生物質、サイトカイン、脂肪酸、糖または目的に応じてその他の化学成分もしくは血清のような生体成分を含有することもできる。ストローマ細胞、哺乳動物から採取したCD34陽性細胞（好ましくはヒト由来のCD34陽性細胞）または培養し増殖したCD34陽性細胞を保存（長期間も含む）する場合、通常の方法を用いることができる。保存の方法としては例えば凍結保存法が挙げられ、この場合必要に応じてグリセリン、エチレンジグリコール、ジメチルスルホキシド（DMSO）、蔗糖、グルコース、ポリビニルピロリドン（PVP）などの凍結防凍剤を加え、プログラムフリーザーなどを用い緩速凍結を行い、その後液体窒素などの中に保存すればよい。

【0044】

【実施例】

実施例1. 材料の調製

(1) ヒトサイトカインおよびモノクローナル抗体  
本実施例で用いたサイトカインは、精製法によって得られたか又は遺伝子組換え法によって得られた市販のものであって、具体的には幹細胞因子（rh-SCF）、顆粒球コロニー刺激因子（rh-G-CSF）、f1k2/f1t3リガンド（rh-

f1k2L)、マクロファージ炎症性タンパク1α（rh-MIP-1α）、可溶性インターロイキン-6受容体（rh-sIL-6R）、インターロイキン-3（rh-IL-3、Genzyme社製）、顆粒球-単球コロニー刺激因子（rh-GM-CSF、Genzyme社製）、インターロイキン-6（rh-IL-6）、精製したエルソロボエチン（EPO、Connaught Laboratories）等である。また、本実施例においてフローサイトメトリーによる細胞表面マーカー解析に用いたモノクローナル抗体（mAbs）については、フルオレセインイソシオシアネート（FITC）標識した抗CD34抗体（クローンHPCA-2）はBeckton Dickinson Immunocytometry System（San Jose社製）から購入し、R-フィコエリスリン（PE）標識抗CD33抗体（クローンWM-15）、PE-標識抗CD13抗体（クローンWM-15）、PE-標識抗CD33抗体（クローンWM-53）およびPE-標識抗CD38抗体（クローンHIT2）はPharmingen社から購入した。

【0045】(2) ストローマ細胞株  
造血支持能を有する（造血幹細胞の造血機能を助ける作用）とストローマ細胞株と造血支持能を有しないストローマ細胞株をマウス骨髄および脾臓から樹立した。造血支持能の有無については、生体外にてDexter-およびWhitlock-Witte-type長期培養によって試験した。本発明において用いた造血支持能を有するマウス由来ストローマ細胞株はHES-5、HES-11、HES-18、HES-18、HES-28、SSXL C L.3、SSXL C L.7、SSXL C L.9及びSSXL C L.17細胞であった。また、造血支持能のないストローマ細胞株としては、HES-M28を調製した。これらの細胞株は、37℃±5℃二酸化炭素10%（V/V）馬血清（HS; ニチメンアメリカ社製）を添加したα-ミニマルエッセンシャルメディアム（alpha-minimal essential medium; α-MEM; 日研バイオメディカルラボラトリー社製）にて培養した。

【0046】実施例2. ヒト臍帯血からのCD34陽性細胞の採取及び調製

ヒト臍帯血は、ドナーに充分なインフォームドコンセントを行なったうえで東京聖路病院産婦人科において採取され、東京聖路病院と日本たばこ産業株式会社医薬基礎研究所で確立されたガイドラインの下で使用した。新生児を出産した後、臍帯を新生児に近い部位にて2カ所クランプにより結紮し、クランプの間を横に切断した。胎盤側の臍帯結紮部位の上部に注射器により吸引採取し、20ユニット/mlになるようにヘパリンを添加した試験管に採取した。この場合、一つの胎盤より50-120mlの臍帯血が採取可能であった。血液サンプルは、ドナーから採取した後、4℃に保存し、4-8時間内に使用した。臍帯血サンプルは、リンフォプレップ（Lymphoprep, Nycomed Pharmacia AS社製）を用いた密度勾配遠心法に従って、比重が1.077g/ml以下の低比重細胞を採取した。次に、CD34陽性細胞とCD34陰性細胞をCD34プロジェニターアイソレーションキット（Progenitor Isolation Kit Q&Bend/10）社製）とMACS-マグネチックセルソーティ

ングシステム (Magnetic Cell Sorting System (Miltenyi Biotec GmbH社製) を用いて、使用説明書マニュアルとアルファメッドプレス (Alpha Med Press, pp. 201-213) に従って分離した。

【0047】実施例3. 臍帯血CD34陽性細胞の領域の決定

CD34陽性細胞 ( $3 \times 10^5$  細胞/ml) を 2 ウェル組織培養プレート (Falcon社製) の各々のウェル中に 2ml のミエロカルトH5100 (12.5%馬血清 (HS) 及び12.5%胎児牛血清 (FCS)、10-4M 2-メルカプトエタノールで増強された  $\alpha$ -MEM; STEMCELL Technologies Inc. 社製) を加え、20 ng/ml の rh-IL-3 及び 50 ng/ml rh-SCF の存在下で培養した。培養して 10 日後、ビベッティングを十分に行ない、細胞を回収し、ナイロンメッシュで濾過後、遠心分離 (1000g、4℃、5分間) して CD34 陽性細胞を回収した。得られた細胞はイムノフルオレッセンス染色を行ない、フローサイトメトリー (FACSsort) で細胞表面マーカーを測定した。

【0048】実施例4. フローサイトメトリー測定

まず、ストローマ細胞非存在下における臍帯血由来 CD34 陽性細胞の特性等についての実験を行なった。CD34 陽性細胞のフローサイトメトリー解析は以下の手順に従って行った。前記の遠心分離によって回収した細胞を、さらに 0.6% 牛血清アルブミン (BSA) と 6mM EDTA を添加した  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  を含まないリン酸緩衝液 (PBS-) に再分散させ、FITC 標識した抗 CD34 抗体及び PE 標識した抗 CD33 抗体で染色した。氷上で 30 分間放置した後、細胞を前述と同じ緩衝液で 3 回洗い、同緩衝液に再分散させた。染色した細胞は、蛍光計測装置 FACSsort (Becton Dickinson Immunocytometry Systems 社製) を用いて、その細胞の大きさ/密度分布の關係及び CD34 抗体/CD33 抗体に対する特性分布を測定した。その結果を図 5 乃至図 8 に示す。

図 5 は臍帯血より分離した CD34 陽性細胞の Forward scatter (FSC: CD34 陽性細胞の大きさを意味する) と Side scatter (SSC: 同密度) の關係を示す図であり、図 6 は FITC 標識抗 CD34 抗体 ( $\alpha$ -CD34)、PE 標識抗 CD33 抗体 (クローン RM-15) で染色したときの FITC 及び PE の蛍光強度、すなわち発現量をそれぞれ示したものである。図 5 によれば、実験に供した CD34 陽性細胞はその細胞の大きさ (FSC) 及び密度の値 (SSC) からみて、破壊死滅した細胞や CD 陰性細胞を含まない正常な CD34 陽性細胞群 (図 5 の R1 領域) であることがわかる。また、図 6 によれば、図 5 の R1 領域に含まれる臍帯血由来 CD34 陽性細胞の CD34 の蛍光強度は FACSsort 解析の結果、FITC カウントが 40 乃至 5000 の集団であり、また、この細胞集団における CD33 分子の発現は、PE カウントで 10 乃至 1000 の集団であった。次に、サイトカインの影響を調べるために上記臍帯血より分離した CD34 陽性細胞をインターロイキン-3 (rh-IL-3) 及び幹細胞因子 (rh-SCF) の存在下で 10 日間培養し、上記と同様にしてその FSC/SSC 分布の關係

及び抗 CD34 抗体/抗 CD33 抗体に対する特性分布を調べた。その結果を図 7 及び図 8 に示す。図 7 によれば、rh-IL-3 及び rh-SCF で 10 日間培養した後の全血球細胞の FSC (細胞の大きさ) 及び SSC (細胞の密度) は、臍帯血より分離したばかりの CD34 陽性細胞のそれら (図 5 参照) よりも全体として大きくなっている傾向が見られ、サイトカインによって細胞の分裂や分化が誘導されたことが示唆される。図 8 は、図 7 の R1 領域 (血球細胞領域) に含まれる血球細胞面分について FITC 及び PE の蛍光強度を測定した結果を示す図であるが、これによれば、臍帯血より分離したばかりの CD34 陽性細胞の FITC カウントは 40 乃至 5000 の集団であったのに対して、培養後の FITC カウントは 4 から 80 に低下していることが判る。また、各種文献の報告によれば、培養後の CD34 陰性細胞の自然蛍光は、分離したばかりの臍帯血 CD34 陽性細胞の時より増加すること即ち、CD34 陽性細胞の多くは、*in vitro* で培養すると CD34 陰性細胞に分化することが知られているが、本実験によってもこのことが裏付けられた。このため、培養後の CD34 陽性細胞中の CD34 弱陽性細胞は CD34 陰性細胞と蛍光強度が重複してしまう可能性が考えられた。そこで CD34 分子の発現が特に高く、明らかに CD34 陰性細胞と異なる集団として認められる領域 (R3 領域) に含まれる CD34 陽性細胞を CD34 強陽性細胞として以後の解析に使用した。図中 R4 領域は CD34 陰性乃至弱陽性細胞集団であるが、我々の検討によれば (図 8 及び後述の図 23 より) R4 領域にしろ CD34 弱陽性細胞の比率は極めて小さかった。またストローマ細胞と共培養すると、ストローマ細胞は通常 R2 領域に含まれる。そのため以後に実際にカウントする CD34 強陽性細胞数の割合 (%) は、R3 領域の細胞のみかけ上の割合 (%) に、R2、R3、R4 各領域に含まれる細胞の割合をすべてたしあわせた値を R3、R4 各領域に含まれる細胞の割合をたしあわせた値で割った値を乗じることによって、FACSsort 上で混入してくるストローマ細胞の値を除外し、この値に全血球細胞数を乗じた後、100 で割ることにより行った。即ち、実際の R2 領域中の細胞数の占める割合の計算式は次のとおりである。

$$\text{実際の R3 (\%)} = \text{見かけの上の R3 (\%)} \times \frac{(R2+R3+R4)}{(R3+R4)}$$

【0049】実施例5. 臍帯血 CD34 陽性細胞とマウスストローマ細胞株の共培養

臍帯血由来の CD34 陽性細胞 ( $5 \times 10^5$  細胞/ml) を 24 ウェル組織培養プレート (Falcon 社製) の各々のウェル中に  $10^5$  M ハイドロコルチゾンを加えたミエロカルト H5100 (12.5% HS 及び 12.5% 胎児牛血清 (FCS)、 $10^{-4}$  M 2-メルカプトエタノールを添加した  $\alpha$ -MEM; STEMCELL Technologies Inc. 社製) を 1ml を加え、さらにサイトカイン (rh-IL-3 及び UFSF) の存在下にマウスストローマ細胞株と共培養 (接核培養) した。培養して 10 日後、ビベッティングを十分に行ない、細胞を回収し、ナイロン

メッシュで濾過後、遠心分離して培養細胞を採取した。得られた細胞をイムノフルオレッセンス染色を行ない、フローサイトメトリー (FACSsort) で細胞表面マーカーを測定した。なお、比較のためにマウスストローマ細胞\*

\* 株を使用しない場合についても同様に実験を行なった。結果を表1に示す。

【0050】

【表1】

表 1

サイトカイン存在下における各ストローマ細胞の全血球細胞及びCD34陽性細胞増殖効果

ストローマ細胞 及び サイトカイン (IL-3+SCF)	0 日		7 日		10 日	
	投入CD34陽性細胞	全血球細胞数 (増加倍率)	CD34陽性細胞数 (増加倍率)	全血球細胞数 (増加倍率)	CD34陽性細胞数 (増加倍率)	
ストローマ細胞 無	5000	12.6×10 <sup>4</sup> (25.2)	2730 (0.55)	72.4×10 <sup>4</sup> (145)	3040 (0.61)	
HESS-1	5000	5.2×10 <sup>4</sup> (10.4)	8710 (1.7)	25.2×10 <sup>4</sup> (50)	9500 (1.9)	
HESS-5	5000	38.6×10 <sup>4</sup> (77.2)	29900 (6.0)	138.4×10 <sup>4</sup> (277)	44400 (8.9)	
SSXL CL.3	5000	17.2×10 <sup>4</sup> (34.4)	7830 (1.6)	87.2×10 <sup>4</sup> (174)	14500 (2.9)	
SSXL CL.7	5000	4.6×10 <sup>4</sup> (9.2)	4140 (0.83)	25.6×10 <sup>4</sup> (51)	6170 (1.2)	
SSXL CL.9	5000	8.0×10 <sup>4</sup> (16.0)	6120 (1.2)	22.4×10 <sup>4</sup> (45)	3490 (0.70)	
SSXL CL.17	5000	5.6×10 <sup>4</sup> (11.2)	5660 (1.1)	18.0×10 <sup>4</sup> (36)	5310 (1.1)	

【0051】ここで、投入した細胞はCD34陽性細胞であって、統計的にはこれらCD34陽性細胞中、約70%がCD34陽性細胞である。従って、表1のCD34陽性細胞の増加倍率は単純に投入細胞数 (5000) で割った数値を示してあるが、実際の増加倍率は統計的な数値 (3500) で割った値であり、増加倍率の数値は更に上昇する。表1によれば、ストローマ細胞の有無に關係なく程度の差はあるがサイトカインを添加することにより全血球細胞は増加することがわかる。しかしながら、CD34陽性細胞についてはストローマ細胞が存在しなければサイトカインを添加しても減少してしまう。さらに、ストローマ細胞株ならびにサイトカイン存在下で全血球細胞の増殖において、HESS-5細胞が最もよい効果を示し、投入後7日目では全血球細胞数の増加倍率は70倍以上になり、投入後10日目では全血球細胞数の増加倍率は270倍以上になることがわかった。さらにCD34陽性細胞数については、ストローマ細胞株のなかでもHESS-5細胞が最も高い効果を示し、投入後7日目では増加倍率は約6倍、投入

後10日目での増加倍率は約9倍になることがわかった。また、ストローマ細胞の種類によるCD34陽性細胞の増加倍率の倍率をみると、投入後10日目ではHESS-5、SSXL CL.3、HESS-1、SSXL CL.7、SSXL CL.17、SSXL CL.9の順でよい効果を示すことがわかった。ここで、特によい増殖効果を示したHESS-5は、国際寄託番号FERM BP-5768を持って、1996年12月6日付で通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託を行った。以上のことにより、サイトカインのみで培養した場合、これらCD34陽性細胞は全血球細胞数を増加させるものの造血の源となる多能性造血幹細胞 (CD34陽性細胞) 数は漸次減少して最終的には枯渇してしまう傾向にあるが、HESS-5等のストローマ細胞を共存せよとむす。これら多能性造血幹細胞が自己増殖して著しく増加していくことが判る。

【0052】実施例6. マウス造血支持ストローマ細胞株 (HESS-5) による誘導血CD34陽性細胞に及ぼすサイトカイン (rh-SCF及びrh-IL-3) とハイドロコルチゾンの

効果  
 臍帯血CD34陽性細胞 ( $5 \times 10^4$  細胞) を24ウェル組織培養プレート (Falcon社製) の各々のウェルに、50ng/mlのSCF及び20ng/mlのIL-3の共存下または非共存下、また10<sup>-6</sup>Mのハイドロコルチゾンの共存下または非共存下の各条件下でミエロカルトH5100 (Stem Cell社製) 1ml中にHESS-5と共培養 (接触培養) することにより、サイトカイン (rh-SCF及びrh-IL-3) 及びハイドロコルチゾンの効果を検討した。培養して10日後、細胞を回収し、イムノフルオレッセンス染色を行い、フローサイトメトリ (FACSsort) にて細胞表面マーカーを測定した。全血球細胞数の増加の結果を図9に、CD34陽性細胞の増加の結果を図10に示した。図9によれば、全血球細胞数はサイトカイン非存在下においてはハイドロコルチゾンの添加、非添加にかかわらず、約  $4 \times 10^4$  個/ウェルであり、ハイドロコルチゾンの効果はないことが明らかになった。サイトカインを添加すると全血球細胞数は、ハイドロコルチゾン添加、非添加にかかわらず著しく増加し、とりわけハイドロコルチゾンが存在すると、非存在下よりも1.5倍 ( $1.2 \times 10^4$  に対し  $1.8 \times 10^4$ ) 上昇した。図10によれば、CD34陽性細胞数は、サイトカイン非存在下においてハイドロコルチゾンを添加した場合のCD34陽性細胞数は  $6 \times 10^4$  となり、もとの約12倍であり、ハイドロコルチゾン非添加の場合も  $1.3 \times 10^4$  となり、同じくもとの約26倍で、ハイドロコルチゾンの非添加の条件の方がCD34陽性細胞に対する増殖効果は高かった。一方サイトカイン存在下では、ハイドロコルチゾンを添加した場合のCD34陽性細胞数はもとの約22倍、同非添加の場合のCD34陽性細胞数はもとの約68倍にも増加した。以上のことから、CD34陽性細胞の増殖については、サイトカイン存在下でハイドロコルチゾン非添加が最も増殖効果が高いことが判る。

【0053】実施例7. rh-SCFおよびrh-IL-3の存在下での、HESS-5と臍帯血CD34陽性細胞の接触共培養におけるCD34陽性細胞の増殖に及ぼす投入CD34陽性細胞密度の影響

臍帯血CD34陽性細胞を、12ウェル培養プレートの各々のウェルにミエロカルトH5100 (Stem Cell社製) 12.5%HS及び12.5%胎児牛血清 (FCS) 2ml中に、HESS-5が接触、非接触の条件下において1ウェル中 ( $4\text{cm}^2$ ) に  $1 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $3 \times 10^5$  細胞の密度になるように播種し、10日間培養した。全血球細胞の増加倍率の結果を図11に示し、CD34陽性細胞の増加倍率の結果を図12に示した。図11によれば、HESS-5が存在しない条件下では、全血球細胞の増殖倍率は投入細胞数が1000個のときが約380倍程度であり、同3000個の時には350倍、同10000個のときには約300倍、同30000個のときは約200倍程度であり、全血球細胞数は投入CD34陽性細胞密度が少ないほど増加倍率が若干向上した。一方、HESS-5が存在 (接触) するときには、全血球細胞数の増殖倍率はそれぞれ約10

50倍、約800倍、約380倍、約150倍を示し、ストローマ細胞 (HESS-5) が存在すると全血球細胞数の増加倍率が著しく向上した。またHESS-5の存在下では、全血球細胞数は投入CD34陽性細胞密度が少ないほど増加倍率が著しく向上した。図12によれば、HESS-5が存在しないときのCD34陽性細胞の増加倍率は、投入細胞数がいずれのときも一桁の増加倍率しか示さなかったものの、HESS-5が存在すると、投入細胞数が1000個のときはCD34陽性細胞の増殖倍率が約60倍であるのに対して同30000個のときはCD34陽性細胞の増殖倍率が約10倍程度であることがわかった。このことから投入細胞の数が1000個から10000個、好ましくは1000個から3000個の条件で、かつストローマ細胞 (HESS-5) を共存させると、CD34陽性細胞の増加倍率が著しく向上することが明らかになった。以上の結果は、投入時のCD34陽性細胞密度が高すぎると増殖効率の低下を招くことを示しており、 $4\text{cm}^2$  ウェルあたり1000から3000個の細胞密度が特に好ましいと考えられる。

【0054】実施例8. 半円形メチルセルロース分析  
 造血幹細胞及び前駆細胞の育成状況を観察するため、市販の半円形のMethocult GF H4434V (Stemcell Technology Inc. 社製、0.9% Iscoveメチルセルロース、30% FCS、1% BSA、10<sup>-6</sup>Mの2-メルカプトエタノール、2mM L-グルタミン、3U/ml エリスロポエチン、50ng/ml のrh-SCF、10ng/ml のrh-G-CSF及び10ng/ml のrh-IL-3を含有している) 培養液を用いて臍帯血由来CD34陽性細胞のコロニー形成能を測定した。まず、臍帯血より分離したCD34陽性細胞を直径35mmの培養ディッシュを用いてミエロカルトH5100培養液中でストローマ細胞 (HESS-5) の存在下又は非存在下で10日間培養した後、同細胞を上記Methocult GF H4434V培養液を充填した直径35mmのディッシュに移し、5%二酸化炭素を含む空气中で21日間、37℃でインキュベートした。一方、対照として臍帯血より分離したCD34陽性細胞をミエロカルト培養液で培養することなく、これを直接上記Methocult GF H4434V培養液で培養した。Methocult GF H4434V培養液中に形成されたBFU-B、CFU-GEMMからなる赤血球系コロニー、CFU-GMコロニー及びHPP-CFCコロニーの数を測定した。HPP-CFCは直径1.0mm以上の大きなコロニーであり、それをさらに直径1.0-2.5mmの小型HPP-CFC、直径が2.5mmより大きい大型HPP-CFCとして算定した。各種条件下における大型HPP-CFC (直径が2.5mmより大きい) のコロニー数の増加倍率の結果を図13に、小型HPP-CFC (直径が1.0-2.5mm) のコロニー数の増加倍率の結果を図14に、CFU-GMのコロニー数の増加倍率の結果を図15に、赤血球系コロニーのコロニー数の増加倍率の結果を図16に示す。図13によれば、大型HPP-CFCのコロニー数の増加倍率においては、ストローマ細胞の存在下の方が非存在下よりも著しい増加効果がみられた。一方ストローマ細胞が存在しないとき、投入細胞のコロニー数の増加倍率は低く、各投入CD



34陽性細胞密度間での有意な差は認められなかった。またストローマ細胞の存在下では、投入細胞数が1000個から3000個ではコロニー数の増加倍率は24-26倍と有意な差はみられないものの、投入細胞数が1000個から30000個と増加するにつれて各々13倍、7倍とコロニー数の増加倍率は低下した。このことから、大型HPP-CFCのコロニー数の増加についても投入CD34陽性細胞密度は4cm2あたり1000から3000個が適当であると判断された。図14によれば、小型HPP-CFC数の増加倍率についても図13の大型HPP-CFC数の増加倍率と同じ傾向を示した。但し、最適初期CD34陽性細胞密度1000から3000個の時の増加倍率は32-36倍であり、大型HPP-CFCの増加倍率より高かった。図15によれば、CFU-GMの増加においてストローマ細胞の存在下の方が非存在下よりもコロニー数の増加倍率において著しい効果があるものの、投入CD34陽性細胞密度が大型HPP-CFCや小型HPP-CFCがストローマ細胞存在下の増加倍率が非存在下のそれと比較して約20倍であるのに対してCFU-GMにおいては約3.5倍と低かった。また初期CD34陽性細胞密度のCFU-GMの増加に及ぼす効果は、大型HPP-CFCや小型HPP-CFCの場合と同様にストローマ細胞存在下で4cm2あたり1000から3000個が最適であり、その時の増殖倍率は600から650倍を示した。図16によれば、BFU-EならびにCFU-GEMを含む赤血球系コロニーの増加倍率は、ストローマ細胞の存在下の方が非存在下よりも著しい効果を示した。またストローマ細胞の存在下では、投入細胞数が3000個の時に最も増加倍率が高く、約46倍を示し、投入細胞数が1000個の時には約27倍であった。投入細胞数を10000、30000個と増やすにつれて増加倍率は低下した。このことから、ストローマ細胞と接触する条件下で投入CD34陽性細胞数は4cm2あたり3000個にすれば、増加倍率が最も高いことが明らかとなった。

【0055】実施例9. 至適培養条件におけるCD34陽性細胞増殖に及ぼすサイトカイン (rh-SCF及びrh-IL-3) 及びストローマ細胞 (HES-5) の効果。マウスストローマ細胞株と臍帯血CD34陽性細胞の培養 CD34陽性細胞 ( $3 \times 10^5$  細胞/ml) を12ウェル組織培養プレート (Falcon社製) の各々のウェル中に2mlのミエロカルトH5100 (12.5%HS及び12.5%胎児牛血清 (FCS) )、 $10^{-8}$  M 2-メルカプトエタノールを添加した $\alpha$ -MEM: STE CELL Technologies Inc. 社製) を加え、さらにサイトカイン (rh-SCF及びrh-IL-3) の存在下又は非存在下にHES-5細胞株の存在下又は非存在下で共培養した。培養して10日後、ビペットを十分に行ない、細胞を回収し、ナイロンメッシュで濾過後、遠心分離して採取した。得られた細胞をイムノフルオレッセンス染色を行

ない、フローサイトメトリー (FACSsort) で細胞表面マーカーを測定した。さらに前述の半圓形のメメルセルロースアッセイによってコロニー形成能を測定した。図17にサイトカイン及びストローマ細胞の存在下で10日間培養したCD34陽性細胞のSSCとFSCのFACSsortによる解析結果を示した。図17によれば、血球細胞数の多くはR1領域に包含されており、HES-5が存在しない以外は同様の条件下で培養した図7の結果と比較しても明らかにR1領域に属する細胞数が多く存在し、どちらかといえば図5で示した臍帯血より分離したばかりのCD34陽性細胞と同様の大きさ、及び密度を示す細胞が多く存在していることが明らかにされた。またR1領域以外のところに、HES-5の細胞やその破片が観察された。図18にサイトカイン及びストローマ細胞の存在下での10日間培養したCD34陽性細胞であって、図17のR1領域に属する血球細胞をFITC標識CD34抗体とPE標識CD33抗体で染色した時のFACSsortによる解析結果を示した。図18とHES-5が存在しない以外は同様の条件下で培養した図8と比較すると、図8においてはCD34陽性細胞が存在するR3領域に、数多くの細胞が存在していることが明らかである。これによれば、図8に示したようにサイトカインのみの場合はCD34陽性細胞、特に強陽性細胞のほとんどは分化、成熟することによって消耗されてしまうが、ストローマ細胞との共培養した場合は、自己複製能を有するCD34強陽性細胞 (多能性造血幹細胞) が依然として存続維持されていることが判る。図19にサイトカインの非存在下で、ストローマ細胞の存在下での10日間培養したCD34陽性細胞におけるSSCとFSCのFACSsortによる解析結果を示した。図19によれば、図17の場合と同様、そのR1領域の細胞分布は、図5で示した臍帯血より分離したばかりのCD34陽性細胞のパターンと類似しており、分裂期の細胞 (分裂期の細胞は大きいためFSCが大きくなる) もサイトカイン存在下、ストローマ細胞非存在下で培養したときよりは少ないものとなっている。図20にサイトカインの非存在下で、ストローマ細胞の存在下での10日間培養したCD34陽性細胞のうちR1領域に含まれる血球細胞のFITC標識CD34抗体とPE標識CD33抗体で染色した時のFACSsortによる解析結果を示した。図20によれば、R3領域に含まれるCD34強陽性細胞の比率は他の実験群の中で最も多かった。また、表2に上記実験操作による各種培養条件下における全血球細胞数ならびにCD34強陽性細胞数の結果を示した。

【0056】

【表2】

表 2

全血球細胞、CD34陽性細胞におけるサイトカイン及びHES-5細胞の増殖効果

条件	全血球細胞数 (個/ウェル)	全血球細胞数 の倍率 (倍)	CD34陽性細胞 数の比率 (%)	CD34陽性細胞数 (個/ウェル)	CD34陽性細胞数 の増加倍率 (倍)
0日 投入CD34陽性細胞数	3000			2390±250	
10日 サイトカイン無 HES-5細胞無	3600±1250	1.2±0.4	23.3±3.6	840±130	0.4±0.1
10日 rhIL-3+rhSCF HES-5細胞無	94000±151000	315.0±50.3	0.5±0.2	4720±1890	2.0±0.8
10日 サイトカイン無 HES-5細胞存在下	63100±12300	21.0±4.1	23.2±4.8	14600±3030	6.1±1.3
10日 rhIL-3+rhSCF HES-5細胞存在下	2544000±499000	848.0±166.0	7.0±1.4	178000±35600	74.0±14.9

【0057】表2によれば、臍帯血CD34陽性細胞をミエロカルトH6100培養液のみで培養した時、全血球細胞数は1.2倍とあまり変化しないものの、CD34陽性細胞の割合は著しく減少するため、計算されたCD34陽性細胞数も0.4倍に減少した。一方、rhIL-3とrhSCFが存在しHES-5が存在しない培養では、全血球細胞数は315±50.3倍増加するもののCD34陽性細胞の増加割合はわずかであり、計算されたCD34陽性細胞の数の増加は約2.0倍であった。一方、臍帯血CD34陽性細胞をサイトカイン非存在下でHES-5細胞の存在下で培養した時、全血球細胞は出発細胞数より21.0±4.1倍増加した。この増加倍率はサイトカインのみ添加した培養と比較して低いものの、CD34陽性細胞を23.2±4.8%含んでいるため、CD3

4陽性細胞の培養数は6.1±1.3倍に増加しており、HES-5がCD34陽性細胞の自己増殖に極めて有効であることが明らかになった。さらにこの培養条件下にサイトカインを添加すると、全血球細胞数はHES-5細胞の存在していない時(315±50.3倍)よりさらに増加した(848±166倍)。CD34陽性細胞数は、サイトカインのみの場合が約2倍であるのに対して、サイトカイン及びHES-5が共存すると74倍となり、両者の組み合わせによって劇的に上昇した。さらに、種々の培養条件下におけるコロニー形成細胞数の結果を表3に示した。

【0058】

【表3】

各コロニーにおけるサイトカイン及びHES-5の増殖効果

条件	コロニー数 (個/ウェル)			
	HPP-CFC(>2.5mm)*	HPP-CFC(1-2.5mm)*	CFU-GM	赤血球系コロニー
0日 投入CD34陽性細胞数	192±40	240±50	300±15	390±60
10日 サイトカイン無 HES-5細胞無	14±6	24±16	119±16	36±7
10日 rh-IL-3+rh-SCF HES-5細胞無	280±170	480±160	54100±14100	800±690
10日 サイトカイン無 HES-5細胞存在下	640±160	4020±420	7500±840	540±280
10日 rh-IL-3+rh-SCF HES-5細胞存在下	8420±810	11400±1110	187165±14100	17700±5000

\*HPP-CFC(>2.5mm)は、HPP-CFCコロニーの直径が2.5mmより大きいコロニーを示し、  
HPP-CFC(1-2.5mm)は、HPP-CFCコロニーの直径が1mmから2.5mmであるコロニーを示す。

【0059】 脐帯血CD34陽性細胞をミエロカルトH5100のみで培養した時、すべてのコロニー数は投入時と比較して著しく減少した。一方、サイトカイン (rh-IL-3及びrh-SCF) の存在下での前駆細胞コロニー数の増加は、投入時 (300±35) と比較してCFU-GMは著しく増加 (54100±14100、約180倍) したものの、小型HPP-CFC (1-2.5mm) と赤血球前駆細胞は投入時 (390±60) と比較して約2倍 (800±690) 程であった。大型HPP-CFC (>2.5mm) は、約1.5倍程 (投入時192±40から培養後280±170) にとどまっていた。これに対して、サイトカイン非存在下でストローマ細胞 (HES-5) が存在する条件下で培養すると、CFU-GMコロニー数 (7500±840) は投入時 (300±35) のそれよりも約25倍の増加する程度であり、赤血球系コロニー数 (540±280) も、投入時 (300±35) のそれよりも約1.4倍増加する程度であった。小型HPP-CFC (1-2.5mm) コロニー数 (投入時240±50、培養後4020±420) は約17倍とサイトカインのみ存在する条件の時よりも著しく増加した。大型HPP-CFC (>2.5mm) コロニー数 (540±160) もサイトカインのみ存在する条件の時よりも増加 (約1.5倍から約3.3倍) した。またストローマ細胞 (HES-5) とサイトカイン (rh-IL-3及びrh-SCF) の存在する条件下では、大型HPP-CFCコロニー数 (8420±810) および小型HPP-CFCコロニー数 (11400±1110) は投入時のそれ (それぞれ192±40、240±50) と比較してそれぞれ約44倍、約48倍と劇的に増加した。CFU-GMのコロニー数 (187165±14100) もサイトカインのみ存在する条件下 (約180倍) よりもさらに増加し、約620倍であった。赤血球系コロニー数は、他の培養条件ではわずかに増加しないものの、HES-5とrh-IL-3とrh-SCFの存在する条件下では著しく増加した (投

入時390±60から培養後17700±500、約44倍)。以上の結果より、ストローマ細胞 (HES-5) が存在すればサイトカインの存在の有無にかかわらずHPP-CFCコロニーは増加することが判る。さらにストローマ細胞 (HES-5) が存在し、サイトカイン (rh-IL-3及びrh-SCF) が存在すればいずれのコロニーも劇的に増加することが判る。

【0060】 実施例10. 増幅後、再分離したCD34陽性細胞の細胞表面マーカー

脐帯血から分離したCD34陽性細胞と、それを生体外で前述のストローマ細胞 (HES-5) とサイトカイン (rh-IL-3及びrh-SCF) の存在する条件下で培養した後、増幅した全血球細胞よりCD34陽性細胞を再びCD34プロジェニターアイソレーションキット (Progenitor Isolation Kit (Qbend/10) 社製) とMACS-マグネチックセルソーティングシステム (Magnetic Cell Sorting System (Miltenyi Biotec GmbH) 社製) を用いて再分離した。再分離したCD34陽性細胞の純度は97%以上であった。その後抗CD34抗体、抗CD33抗体、抗CD38抗体及び $\alpha$ 抗CD13抗体を用いてFACSsortにてCD34、CD33、CD38及びCD13の発現量を解析した。分離したばかりの脐帯血CD34陽性細胞と、増幅後再分離したCD34陽性細胞のFSCとSSCの解析結果をそれぞれ図21および図22に示した。再分離したCD34陽性細胞は、大きさおよび密度が分離したばかりの脐帯血CD34陽性細胞のそれより大きくなっていることから、細胞が分裂期に移行していることが予測される。続いて、血球細胞領域 (図21または図22のR1領域) に含まれる細胞について、各種細胞表面マーカーを解析した。脐帯血CD34陽性細胞と増幅後再分離したCD34陽性細胞のCD34とCD33の染色パターンをそれぞれ図23及び図24に、またCD34とCD38の染色パターンをそれぞれ図25及び図26

に、同じくCD34とCD13の染色パターンをそれぞれ図27及び図28に示した。再分離したCD34陽性細胞中のCD33陽性細胞(図24)の割合は新鮮な分離されたCD34陽性細胞(図23)よりも明らかに増加した(それぞれ73.9(1.0±63.8)%と93.6(17.2±76.4)%)。このことは、再分離したCD34陽性細胞が、新鮮なCD34陽性細胞と比較してCFU-GEMM、CFU-GM、Eo-CFC、BFU-Eがより増加していることを意味する。しかしながら、再分離のものはCD34強陽性細胞領域が著しく増加していることは注目すべきである。図25、図26から明らかのように、CD34強陽性CD38強陽性細胞の割合もin vitro増幅後の再分離CD34陽性細胞においては著しく増加しており、再分離したCD34陽性細胞中のCD34強陽性CD38低陽性/陰性細胞集団の割合(3.5%)は、臍帯血の割合(6.2%)より減少していた。しかしながらCD34強陽性CD38低陽性/陰性細胞数からみれば、CD34強陽性細胞は増幅後74倍増加しているため(表2参照)、CD34強陽性CD38低陽性/陰性細胞数は増幅によって42(74×3.5/6.2)倍増加していることが明らかになった。この増加倍率は、HPP-CFC数の増加倍率と良く一致していた。図27、図28によれば臍帯血CD34陽性細胞のCD34強陽性CD13低陽性/陰性細胞集団はCD33およびCD38抗原の発現と比較して逆に増加していた(それぞれ12.4%、16.1%)。全体の細胞数が増加し、割合も増加していることから、CD34強陽性/CD13低陽性/陰性細胞数、つまり骨髄系細胞の分化が決定する以前の細胞が増加していることがわかる。臍帯血CD34陽性細胞中のCD34強陽性細胞とCD34低陽性細胞の割合は増幅後も変化は見られなかった(図23及び図24より、それぞれ79.7(63.8±15.9)%、79.5(76.43.1)%)。BrexnerらはCD34陽性細胞中にCD34強陽性細胞が22%含まれており、非常に未分化な細胞の性質を示すことを報告しているが、これと同じレベルでFACSsortを解析すると、in vitro増幅後、このCD34強陽性細胞は再分離したCD34陽性細胞の中に非常に高い割合で含まれていた(55.0%)。

#### 【0061】実施例11. 増幅前後のCD34陽性細胞の細胞周期の解析

臍帯血から分離したCD34陽性細胞を生体外で前述のサイトカイン(rh-IL-3及びrh-CSF)の存在下、ストローマ

細胞(HESS-5)と共培養した後、増幅した全血球細胞よりCD34陽性細胞を再びCD34プロジェクターアインソーシオンキット(Progenitor Isolation Kit (Gend)社製)とMACS-マグネチックセルソーティングシステム(Magnetic Cell Sorting System (Miltenyi Biotec GmbH)社製)を用いて再分離した。このようにして得られた増幅CD34陽性細胞と、臍帯血から分離したばかりのCD34陽性細胞をニトリの赤血球と胸腺細胞の細胞核をコントロールとして、G0/G1相、S相及びG2/M相の各相の細胞周期の割合をFACSsortに付属しているCellFIT software (Becton Dickinson)を用いて解析した。臍帯血CD34陽性細胞と増幅後再分離したCD34陽性細胞の細胞周期の解析結果をそれぞれ図29及び図30に示した。一般に増幅相はS-およびG2/M期の間の周期であることが知られており、臍帯血より分離したばかりのCD34陽性細胞はわずかに2.6(S相1.3+G2/M相1.3)%だけ増幅相であった。一方、増幅後再分離したCD34陽性細胞では41.6(S相16.6+G2/M相25.0)%が増幅相に存在しており、この結果は、サイトカインとストローマ細胞の存在下での培養は、CD34陽性細胞に関して静止期の細胞が多い臍帯血CD34陽性細胞の細胞周期をSまたはG2/M期に促進することを示している。

#### 【0062】実施例12. 臍帯血CD34陽性細胞の増殖に及ぼすHESS-5ならびに各種サイトカインの効果

臍帯血CD34陽性細胞を、12ウェル培養プレートの各々のウェルにミエロカルトH5100(Stem Cell社製12.5%HS及び12.5%胎児牛血清(FCS))2ml中に、HESS-5が接触、非接触の条件下において1ウェル中(4cm<sup>2</sup>)に3×10<sup>6</sup>細胞の密度になるように播種した。次に種々の濃度のヒトサイトカインをウェルに添加し、10日間培養した。各々のサイトカインの最終濃度は、20ng/mlのIL-3、50ng/mlのSCF、50ng/mlのfLKL、100ng/mlのMIP-1α、20ng/mlのG-CSF、1U/mlのEPO、20ng/mlのGM-CSFであった。培養10日後、細胞を回収し、フローサイトメトリー(FA Csort)で細胞表面マーカーを測定した。結果を表4に示す。

#### 【0063】

#### 【表4】

表 4

全血球細胞、CD34陽性細胞における各種サイトカイン及びHESS-5細胞の増殖効果

サイトカイン	全血球細胞数の増加倍率 (倍)		CD34陽性細胞の増加倍率 (倍)	
	w/o HESS-5*	w HESS-5*	w/o HESS-5*	w HESS-5*
none	1.0	6.7	0.1	2.8
IL-3	20.7	133	1.1	29.0
SCF	9.3	110	0.2	28.3
IL-3+SCF	70.0	258	1.5	44.0
IL-3+SCF+IL2 ligand	310	446	2.7	18.0
IL-3+SCF+MIP-1 $\alpha$	89.0	127	1.6	19.0
IL-3+SCF+G-CSF	226	366	1.9	25.0
IL-3+SCF+EPO	543	400	3.4	54.0
IL-3+SCF+G-CSF+GM-CSF	193	460	1.9	27.7

\* w/o HESS-5はHESS-5細胞非存在下であり、w HESS-5細胞はHESS-5細胞存在下を示す。

【0064】なお、表4には、HESS-5存在下または非存在下におけるサイトカインの組み合わせの全血球細胞数ならびにCD34陽性細胞数の増加倍率を示した。全血球細胞数は、HESS-5の存在、非存在にかかわらず、いずれの場合も各種サイトカインの存在によりその数は増加した。また、逆にサイトカインの有無またはその種類のいかんを問わずIL-3+SCF+EPOの場合を除いて、HESS-5細胞の存在により全血球細胞及びCD34陽性細胞に関する増加倍率は向上した。全血球細胞数の増加倍率は、HESS-5細胞の非存在下ではIL-3+SCF+EPOが最も高く、543倍を示し、以下順にIL-3+SCF+f1k2L、IL-3+SCF+G-CSF、IL-3+SCF+G-CSF+GM-CSF、IL-3+SCF+MIP-1 $\alpha$ 、IL-3+SCF、IL-3、SCF、サイトカインなしの順であった。一方、HESS-5が存在する条件下では、IL-3+SCF+G-CSF+GM-CSFが最も高い増加倍率を示した。以下順にIL-3+SCF+f1k2L、IL-3+SCF+EPO、IL-3+SCF+G-CSF、IL-3+SCF、IL-3、IL-3+SCF+MIP-1 $\alpha$ 、SCF、サイトカインなしの順であった。CD34陽性細胞数の増加倍率については、HESS-5が存在しない条件下では0.1倍から最大3.4倍といずれのサイトカインの組み合わせでも顕著な増殖は認められなかった。一方、HESS-5下に各種サイトカインを組み合わせることによってCD34陽性細胞の増加倍率と比べて10倍以上の増殖効果は著しく向上された。サイトカインの組み合わせに関しては、IL-3+SCF+EPOが最も高く54倍であった。以下順にIL-3+SCF、IL-3、IL-3+SCF+G-CSF+GM-CSF、SCF、IL-3+SCF+G-CSF、IL-3+SCF+MIP-1 $\alpha$ 、IL-3+SCF+f1k2L、サイトカイン無の順であった。

【0065】実施例13、臍帯血CD34陽性細胞とHESS-5細胞の接触共培養、臍帯血CD34陽性細胞とHESS-5細胞の非接触共培養及び臍帯血CD34陽性細胞とHESS-5細胞の間接接触培養

CD34陽性細胞 ( $5 \times 10^3$  細胞/ウェル) を6ウェル組織培養プレート (Falcon社製) の各々のウェル中に、50ng/mlのSCFおよび20ng/mlのIL-3を添加した4mlのミエロカルトH5100 (12.5%HS及び12.5%胎児牛血清 (FCS))、 $10^{-6}$ Mの2-メルカプトエタノールを添加した $\alpha$ -MEM; STECELL Technologies Inc.社製) 中でHESS-5の非存在下またはHESS-5の存在下に培養した。HESS-5とCD34陽性細胞の共培養条件としては、図2、図3(a)及び図4(a)に例示したように単なる接触状態、支持体を介した非接触状態及び支持体を介した間接接触状態でそれぞれ培養を行なった。図2で例示される接触状態における共培養は、6ウェルプレート上にHESS-5細胞を播種し、さらにそのHESS-5細胞上にCD34陽性細胞を層状に播種することによって実施した。また、図3(a)で例示される非接触状態における培養は、HESS-5細胞を播種した6ウェルプレート中に、Cyclopore膜 (孔径0.45 $\mu$ m) を取り付けてあるセルカルチャーインサート (Cell Culture Insert) (Falcon社製: 多数の微細孔を有するシルクハット形状のプラスチック製支持体) を挿入するとともに該支持体の内側にCD34陽性細胞を $5 \times 10^3$ 個播種した (図3(a)参照)。図4(a)で例示される間接接触状態における培養は、次のようにして実施した。HESS-5細胞と臍帯血CD34陽性細胞を支持体を構成するCyclopore

α膜の両側で培養させるために、まず10%馬血清 (HS) を添加した  $\alpha$ -MEM200ml を充填した無菌の500ml ビーカー中に上下転置した状態でセルカルチャーインサート (Cell Culture Insert) (Falcon社製) を挿入し、その上面 (外側: シルクハット形状支持体の底面) に、HESS-5細胞のサスペンション ( $5 \times 10^6$  細胞/ml) 1ml をピペットで静かに重層し、5%二酸化炭素を含む空気中で37°Cで培養した。培養48時間後、膜の底面外側にHESS-5が定着したセルカルチャーインサートを無菌のピンセットでビーカーから取り出し、6ウェル培養プレート中に図4(a)のごとくセットした。次いで、臍帯血CD34陽性細胞 ( $5 \times 10^6$  細胞/ウェル) をセルカルチャーインサートの底面内側に播種し、前述と同様の条件で共培養 (間接接合培養) した。なお、対照としてHESS-5細胞非存在下のCD34陽性細胞の培養も行なった。それぞれ10日間培養の後、細胞をピペティングし、ナイロンメッシュで濾過し、遠心分離を行なつて、回収した。これらの細胞を前述と同様にイムノフローレンセンスで染色し、細胞表面マーカーをフローサイトメトリー (FACS) で解析した。全血球細胞およびCD34陽性細胞の増加倍率をそれぞれ図31及び図32に示す。図31によれば、全血球細胞の増加倍率は、図4(a)のごとく膜の両面にCD34陽性細胞とHESS-5細胞を間接接合させた状態で共培養したものが著しい増殖効果を示し、ストローマ細胞非存在下の増加倍率に比べて約2.5倍であり、このとき全血球細胞の増加倍率は約820倍であった。一方、ストローマ細胞非存在下の増加倍率と比べてHESS-5との接合培養、間接接合培養はそれぞれ1.5倍、1.2倍であり、HESS-5との接合培養では400倍、HESS-5との非接合培養では約350倍、ストローマ細胞の非存在下では約270倍の増殖効果を示した。図32によれば、CD34陽性細胞のストローマ細胞の非存在下で4倍、HESS-5との接合培養では約42倍、HESS-5との非接合培養では約15倍であり、3条件の中では接合共培養が最も高い効果を示した。非接合共培養では全血球細胞数の増加倍率は接合共培養と大きな違いはなかったものの、CD34陽性細胞数の増加倍率に関しては約1/2.8に低下していた。一方、支持体膜の両面を用いた間接接合共培養では、CD34陽性細胞数の増加倍率は約40倍と接合共培養とほぼ同等の増殖効果を示した。以上のことから、HESS-5等のストローマ細胞の存在下にCD34陽性細胞を培養する場合、必ずしも両細胞を直接接合させる必要はなく、両者を同一培養容器内で非接合又は間接接合の状態で培養してもよいことが伺われる。特に非接合培養法及び間接接合培養法は、培養後に両細胞を分離しCD34陽性細胞を取り出すのに好都合であつて、実用化に大いに役立つものである。

【0066】実施例14. マウスストローマ細胞株HESS-18及びHESS-M28の調製

C3H/HeNマウスの骨髄から取得したストローマ細胞を、

$\alpha$ -MEM培地 (10%馬血清、デオキシスクレオチド及びデオキシリボスクレオチドを含む。日研バイオメディカルラボラトリー製) 中で長期培養し、限外希釈法によりクローニングした。得られたストローマ細胞亜株を、ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞と共培養し、CD34陽性細胞を増幅する能力が高い細胞株を選択した。得られた細胞株をHESS-18と命名した。HESS-18は、国際寄託番号FERM BP-6187を以て通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に1997年11月28日付で国際寄託した。該HESS-18ストローマ細胞株を、 $\alpha$ -MEM培地 (10%馬血清、デオキシスクレオチド及びデオキシリボスクレオチドを含む。日研バイオメディカルラボラトリー製) 中で5カ月間培養し、限外希釈法によりクローニングした。得られたストローマ細胞亜株を、ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞と共培養し、CD34陽性細胞を増幅する能力が高い細胞株を選択した。得られた細胞株をHESS-M28と命名した。HESS-M28は、国際寄託番号FERM BP-6186を以て通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に1997年11月28日付で国際寄託した。一方、同時に、CD34陽性細胞を増幅する能力の低い細胞株HENS-M12もクローニングされた。なお、本実験で使用したヒト臍帯血由来CD34陽性細胞は、実施例2及び実施例3と同様にして取得した。得られたCD34陽性細胞の形態及び細胞表面抗原発現型を、実施例3及び実施例4と同様にして分析した。結果を図34(a)及び(b)に示した。

【0067】実施例15. マウスストローマ細胞株のヒトCD34陽性細胞の増殖能の分析  
前述のようにして調製したマウスストローマ細胞株HESS-5 (国際寄託番号: FERM BP-5768)、HESS-18 (国際寄託番号: FERM BP-6187)、HESS-M28 (国際寄託番号: FERM BP-6186) 及びHENS-M12のCD34<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup>であるヒト造血幹細胞の増殖能力を下記のようにして測定した。実施例5と同様にして、前記ヒト臍帯血CD34陽性細胞を、組織換えヒトIL-3 (20ng/ml) 及び組織換えヒトSCF (幹細胞因子、50ng/ml) を含む栄養培地中で、上記各々のストローマ細胞と共に10日間培養 (接合培養) した。実施例3及び実施例4と同様にして、フローサイトメーターFACSを用いて、培養後の全造血幹細胞、CD34<sup>+</sup>細胞、並びにCD34<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup>細胞の特性及び総数を測定した。なお、対照としていずれのストローマ細胞も含まない培養を行った。結果を、図35乃至図39に示す。また、同様にして、フローサイトメーターを用いて、HESS-5、HESS-18及びHESS-M28とともに共培養して得られた細胞群から分離した各々のCD34<sup>+</sup>細胞の特性についても分析した。結果を図40乃至図42に示す。さらに、該フローサイトメーターで得られた結果を、数値化し、細胞数及び算出した増殖率を表5に示した。

【0068】

【表5】

表5

細胞株	全血血球細胞の量 ( $\times 10^5$ /フラスコ)	全血血球細胞の増殖率 (倍)	CD34 <sup>hi</sup> 細胞の量 ( $\times 10^5$ /フラスコ)	CD34 <sup>hi</sup> 細胞の増殖率 (倍)	CD34 <sup>hi</sup> CD38 <sup>low</sup> 細胞の量 ( $\times 10^5$ /フラスコ)	CD34 <sup>hi</sup> CD38 <sup>low</sup> 細胞の増殖率 (倍)
ストローマ細胞 クローン	1.2 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.4	0.3 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	未測定	—
マウス骨髄由来 ストローマ細胞株	366.0 $\pm$ 82.0	366.0 $\pm$ 82.0	74.5 $\pm$ 17.4	102.1 $\pm$ 28.1	39.6 $\pm$ 0.8	92.1 $\pm$ 1.9
HES-5	421.3 $\pm$ 45.5	421.3 $\pm$ 45.5	103.6 $\pm$ 11.2	142.0 $\pm$ 15.3	92.7 $\pm$ 14.4	215.6 $\pm$ 23.3
HES-18	40.7 $\pm$ 2.2	40.7 $\pm$ 2.2	13.6 $\pm$ 0.7	18.6 $\pm$ 1.0	9.4 $\pm$ 0.5	21.7 $\pm$ 1.2
HES-M2	406.3 $\pm$ 41.1	406.3 $\pm$ 41.1	93.7 $\pm$ 9.4	128.4 $\pm$ 13.9	143.3 $\pm$ 14.4	333.2 $\pm$ 33.4

\*培養に供したヒト臍帯血CD34陽性細胞の初期細胞数は、 $1 \times 10^5$ 個/フラスコ（その内、線CD34<sup>hi</sup>細胞数は、73,000個、及びCD34<sup>hi</sup>CD38<sup>low</sup>細胞数は4,300個）。値は、平均値 $\pm$ SD（標準偏差）。

【0069】表5から明らかなように、HES-5、HES-18及びHES-M28は、いずれもCD34<sup>+</sup>細胞を約100倍の増幅した。またHES-5、HES-18及びHES-M28は、該CD34<sup>+</sup>細胞に含まれる、より未分化な幹細胞であるCD34<sup>hi</sup>CD38<sup>low</sup>細胞を、各々9.2倍、21.6倍及び33.3倍の増幅した。HES-18及びHES-M28についてのこれらの値は、驚くべき値である。

【0070】実施例16. マウスストローマ細胞の共存下で培養して増幅されるヒトCD34陽性造血幹細胞の性質の分析(1)

実施例15の実験において、マウスストローマ細胞株HES-5、HES-18及びHES-M28の各々が、ヒトCD34陽性造血幹細胞を有意に増幅する能力を有すること、換言すれ

ば、臍帯血等から取得されるヒトCD34陽性造血幹細胞を、該細胞株のいずれかとともに共培養することにより、ヒトCD34陽性造血幹細胞、特により未分化な幹細胞であるCD34<sup>hi</sup>CD38<sup>low</sup>細胞を、短期間の培養で簡便に大量に製造できることが実証された。本実験の目的は、そのようにして増幅されたCD34陽性細胞が、ヒト臍帯血等から単離した新鮮な天然のCD34陽性細胞と何ら異なることなく、該天然のCD34陽性細胞を同一の性質を有するCD34陽性細胞であることを確認するものである。本実験では、該CD34<sup>hi</sup>CD38<sup>low</sup>細胞が有する、自己複製能、形態及び分化抗原表現型の観点からの確認を行った。実施例2及び実施例3と同様の方法、即ち、CD34 P rogenitor Isolation Kit (Q&Bend/10) 及びMACS Cell S

orting System (Miltenyi Biotec GmbH, Glandbach, ドイツ)を用いて、ヒト臍帯血、並びに実施例5においてマウスストローマ細胞株 (HESS-5、HESS-18、及びHESS-M28) との共培養により製造された造血幹細胞群から、各々CD34陽性細胞を単離した。次いで、単離した各々CD34陽性細胞群を、FACSsortフローサイトメーター (Beckon Dickinson Immunocytometry Systems) に供し、細胞選別 (cell sorting) し、より未分化な造血幹細胞であるCD34<sup>high</sup> CD38<sup>low</sup> 細胞を単離した。フローサイトメーターを用いて分析した、各々のCD34<sup>high</sup> CD38<sup>low</sup> 細胞群の特性を図43乃至図46に示した。なお、図34(b)からも明らかなように、ヒト臍帯血CD34陽性細胞に含まれるCD34<sup>high</sup> CD38<sup>low</sup> 細胞は、通常約3乃至4.5%である。カルチャープラスコ (75cm<sup>2</sup>, Falcon製)を用い、単離した各々のCD34<sup>high</sup> CD38<sup>low</sup> 細胞 (各々1×10<sup>5</sup>個/ml) を、組織換えヒトIL-3 (20ng/ml) 及び組織換えヒトSCF (50ng/ml) を加えたMyelocult H5100栄養培地 (30ml, 12.5%馬血清、12.5%牛胎児血清、10<sup>-6</sup>Mの2-メルカプトエタノールを含むαMEM培地; StemCell Technologies Inc. 製) 中で、マウスストローマ細胞HESS-5と共に10日間共培養 (接触培養) した。ビベッティングにより細胞を回収し、ナイロンメッシュを通じて濾過した後、遠心分離した。得られた細胞の特性を、免疫染色試験法及びフローサイトメーターによる分化抗原分析により分析した。結果を図47乃至図50に示した。さらに、該フローサイトメトリーで得られた結果を、数値化し、細胞数及び算出した増殖率を表6に示した。

【0071】

【表6】

30

表6

HESS-5との二次共培養に供したCD34 <sup>high</sup> CD38 <sup>low</sup> 細胞	ヒト臍帯血から単離した新鮮なCD34 <sup>high</sup> CD38 <sup>low</sup> 細胞 各々ストローマ細胞との一次共培養により増殖させた細胞群から単離したCD34 <sup>high</sup> CD38 <sup>low</sup> 細胞	造血幹細胞の数 (×10 <sup>5</sup> 個/ウェル)	全造血幹細胞の増殖率 (倍)	CD34 <sup>high</sup> 細胞の数 (×10 <sup>5</sup> 個/ウェル)
HESS-5との一次共培養で増殖されたCD34 <sup>high</sup> CD38 <sup>low</sup> 細胞	HESS-18との一次共培養で増殖されたCD34 <sup>high</sup> CD38 <sup>low</sup> 細胞	15.0 ± 2.0	500 ± 67	2.5 ± 0.2
HESS-M28との一次共培養で増殖されたCD34 <sup>high</sup> CD38 <sup>low</sup> 細胞	HESS-M28との一次共培養で増殖されたCD34 <sup>high</sup> CD38 <sup>low</sup> 細胞	24.6 ± 3.3	821 ± 108	3.1 ± 0.4
		22.1 ± 2.1	738 ± 69	4.4 ± 0.4
		21.1 ± 2.4	702 ± 78	5.4 ± 0.6

\*値は、平均値 ± S.E.

【0072】該図から明らかなように、実施例5においてHESS-5、HESS-18及びHESS-M28の各々の共培養 (一次培養) により増殖、製造された各々のCD34<sup>high</sup> CD38<sup>low</sup> 細胞、並びにヒト臍帯血から単離した新鮮なCD34<sup>high</sup> CD38<sup>low</sup> 細胞を、HESS-5と再度共培養 (二次培養) することにより、いずれの細胞群においてもCD34<sup>high</sup> CD38<sup>low</sup> 細胞が誘導された。また、各々のHESS-5二次培養系で増殖、製造されるCD34<sup>high</sup> CD38<sup>low</sup> 細胞の特性 (図48 (先にHESS-5上で増殖)、図49 (先にHESS-18上で増殖) 及び図50 (先にHESS-M28上で増殖)) は、ヒト臍帯血から単離した新鮮なCD34<sup>high</sup> CD38<sup>low</sup> 細胞をHESS-5と共培養して得られるCD34<sup>high</sup> CD38<sup>low</sup> 細胞の特性 (図51) と同一であった。また、表



45

6から明らかなように、各々のHESS-5二次培養系で選出されるCD34<sup>hi</sup> CD38<sup>int</sup> 細胞の増幅は、増殖細胞数及び増殖率の観点からも、ヒト臍帯血から単離した新鮮なCD34<sup>hi</sup> CD38<sup>int</sup> 細胞のHESS-5との共培養による増幅とほぼ同じであった。このことから、ヒト臍帯血から単離した新鮮なCD34陽性細胞をマウスストローマ細胞株(HESS-5、HESS-18、及びHESS-M28)と共培養して増幅されるCD34陽性細胞は、ソースとして用いたヒト臍帯血から単離した新鮮なCD34陽性細胞と同一の特性を有する細胞であり、また本願発明の方法を用いれば、ヒト生体に存在する天然のCD34陽性細胞、特により未分化な造血幹細胞であるCD34<sup>hi</sup> CD38<sup>int</sup> 細胞を簡便に大量に製造できることが明らかとなった。

【0073】実施例17. マウスストローマ細胞の共存下で培養して増幅されるヒトCD34陽性造血幹細胞の性質の分析(2)

実施例16で述べた選出の目的のために、本実験では、該CD34<sup>hi</sup> CD38<sup>int</sup> 細胞が有する細胞分化能の観点からの確認を行った。なお、本実験では、一例としてB前駆細胞への分化能について分析した。B前駆細胞の培養は、ローリングスらにより報告された方法(B. J. Rawlings, Exp. Hematol., 25, 66 (1991))に従って行った。実施例16で単離した各々のCD34<sup>hi</sup> CD38<sup>int</sup> 細胞(即ち、(1)ヒト臍帯血由来のCD34陽性細胞群から単

46

離した新鮮なCD34<sup>hi</sup> CD38<sup>int</sup> 細胞、(2)HESS-5との一次共培養から得られたCD34陽性細胞群から単離した新鮮なCD34<sup>hi</sup> CD38<sup>int</sup> 細胞、(3)HESS-18との一次共培養から得られたCD34陽性細胞群から単離した新鮮なCD34<sup>hi</sup> CD38<sup>int</sup> 細胞、及び(4)HESS-M28との一次共培養から得られたCD34陽性細胞群から単離した新鮮なCD34<sup>hi</sup> CD38<sup>int</sup> 細胞、各々1×10<sup>5</sup>個/ウェル)を、RPMI-1640培地(2ml, 日研バイオメディカルラボラトリー製。なお、3%牛胎児血清(GIBCO-BRL製)、50mMの2-メルカプトエタノール、及び50ng/mlの組換えヒトFlt-2/Flt-3リガンド(PeproTech EC製)を含む。)中で、マウスストローマ細胞株HESS-6と共培養(接触培養)した。培養後、各々の細胞を回収し、FITC(フルオレセインイソチオシアネート)標識抗CD19モノクローナル抗体及びPE(フィコエリスリン)標識抗CD10モノクローナル抗体で染色し、培養により生成されるB前駆細胞の含量をフローサイトメーターFACSsortを用いて分析した。なお、CD19陽性CD10陽性であることが、B前駆細胞であることの指標の一つである。結果を図5乃至図54に示した。さらに、該フローサイトメーターで得られた結果を、数値化し、細胞数及び算出した増殖率を表7に示した。

【0074】

【表7】

表 7

HESS-5との二次共培養に供したCD34 <sup>high</sup> CD38 <sup>low</sup> 細胞	全細胞の増幅率 (倍)	B前駆細胞の含有率 (%)
ヒト臍帯血から単離した新鮮なCD34 <sup>high</sup> CD38 <sup>low</sup> 細胞 各種ストローマ細胞との一次培養により増幅された 細胞群から単離したCD34 <sup>high</sup> CD38 <sup>low</sup> 細胞	114.6 ± 8.6	85.1 ± 5.9
HESS-5との一次共培養で増幅されたCD34 <sup>high</sup> CD38 <sup>low</sup> 細胞	101.7 ± 16.3	82.3 ± 3.3
HESS-18との一次共培養で増幅されたCD34 <sup>high</sup> CD38 <sup>low</sup> 細胞	122.0 ± 17.0	76.7 ± 6.5
HESS-M28との一次共培養で増幅されたCD34 <sup>high</sup> CD38 <sup>low</sup> 細胞	127.3 ± 22.3	85.0 ± 2.3

\* 値は、3回の実験の平均値 ± S.D.

【0075】該図から明らかなように、実施例5においてHESS-5、HESS-18及びHESS-M28の各々の共培養（一次培養）により増幅、製造された各々のCD34<sup>high</sup>CD38<sup>low</sup>細胞、並びにヒト臍帯血から単離した新鮮なCD34<sup>high</sup>CD38<sup>low</sup>細胞を、HESS-5と再度共培養（二次培養）することにより、いずれの細胞群においてもB前駆細胞が誘導された。また、各々のHESS-5二次培養系で増幅、製造されるB前駆細胞の特性（図5-2（先にHESS-5上で増幅）、図5-3（先にHESS-18上で増幅）及び図5-4（先にHESS-M28上で増幅））は、ヒト臍帯血から単離した新鮮なCD34<sup>high</sup>CD38<sup>low</sup>細胞をHESS-5と共培養して得られるB前駆細胞の特性（図5-1）と同一であった。また、表7から明らかなように、各々のHESS-5二次

培養系で達成されるB前駆細胞への分化の特性は、増幅細胞数及び増殖率の観点からも、ヒト臍帯血から単離した新鮮なCD34<sup>high</sup>CD38<sup>low</sup>細胞のHESS-5を用いた二次培養における結果とほぼ同じであった。このことから、ヒト臍帯血から単離した新鮮なCD34陽性細胞をマウスストローマ細胞株（HESS-5、HESS-18、及びHESS-M28）と共培養して増幅されるCD34陽性細胞は、ソースとして用いたヒト臍帯血から単離した新鮮なCD34陽性細胞と同一の特性を有する細胞であり、また本願発明の方法を用いれば、B前駆細胞等へ分化することができる多分化能を有するヒト生体に存在する天然のCD34陽性細胞、特により未分化な造血幹細胞であるCD34<sup>high</sup>CD38<sup>low</sup>細胞を簡便に大量に製造できることが明らかとなった。

## 【0076】実施例18. 細胞培養器具の製造

本願発明の方法によるCD34造血幹細胞の製造を、医療現場及び/または産業上で簡便に実施するための細胞培養器具を設計、作成した。なお、下記に記載される器具は、単なる一例であり、本願発明の器具が該一例に限定されるものではないことは言うまでもない。本実施例に示される器具は、図33に例示されるような構成を有し、各々の要素（部材）は、下記のような性状を有する。

## (1) 第1の膜

<材質>ポリエチレンテレフタレート  
<孔径>0.4~0.45マイクロメートル  
<孔数>約10孔/cm<sup>2</sup>  
<大きさ>縦12cm×横10cm  
<厚さ>12ミクロン

## (2) 第2の膜、及び第3の膜

<材質>市販品のバッグであるSI CULTURE BAG (Tissue Culture Supplies & Consumables社製、USA; 代理店: 和光純薬) と同一の材質の膜  
<大きさ>縦12cm×横10cm  
<性質>二酸化炭素透過性

## (3) 不溶性の枠

<材質>硬質プラスチック  
<厚さ>約1.5ミリメートル  
<外径>縦12cm×横10cm  
<内径>縦10cm×横8cm  
<径高>四方ともに1cm

(4) 管 (第1の膜と第2の膜との間及び第1の膜と第3の膜の間に配備される)

<材質>シリコンチューブ  
<内径>約2~3ミリメートル  
<長さ>約16cm

前記(3)のプラスチック枠の部分に固定される部分 (約1cm。枠より内部には突出しないのが好ましい。)

及び前記(2)のバッグの外に出る約1.4cmかなる。チューブの末端 (バッグ外) には、開栓及び閉栓できるルアーロック式のアダプターを配備した。

## (5) 器具の構築

第1の膜(1)を、プラスチック枠(3)の四方の枠部分に常法に従って、剥がれないように強固に圧着させた (なお、不溶性の接着剤で接着させることも可能である)。次いで、このプラスチック枠の上面及び下面の各々の四方の枠部分に、常法に従って、第2の膜及び第3の膜を、剥がれず、また培養液や細胞が器具の外に漏出しないうように強固に圧着させた (なお、不溶性の接着剤で接着させることも可能である)。なお、該第1の膜を張り付けたプラスチック枠への第2の膜の圧着に際しては、枠の辺にシリコンチューブ(4)を同時に取り付け付けた。第3の膜の圧着に際しては同時に該チューブを取り付けた。このようにして、その内部に2つの遮蔽系を有

し、該各々の系(バッグ内)に空気、液体及び細胞を注入、及び該系からそれらを排出可能な2本のチューブを記した2層構造の培養バッグを作成した。第1の膜と第2の膜との間に形成された遮蔽系に、該シリコンチューブを通じて、Myelocult H5100栄養培地(30ml, 12.5%馬血清、12.5%牛胎児血清、10-4Mの2-メルカプトエタノールを含むαMEM培地; Stem Cell Technologies Inc. 製)中に懸濁させた前述の種々のマウスストローマ細胞株 (例えば、HES5-5) を注入し、該第1の膜上に該ストローマ細胞を接着させた。次いで、該チューブを通じて、遮蔽系から空気を除去した。一方、第1の膜と第3の膜との間に形成された遮蔽系に、シリコンチューブを通じ、組織ヒトIL-3及び組織ヒトSCFを含有するMyelocult H5100栄養培地中に懸濁させたヒト臍帯血由来CD34陽性細胞を注入した。次いで、該チューブを通じて、遮蔽系から空気を除去した。培養バッグを静置して、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で、培養し、CD34陽性造血幹細胞を増幅させた。

## 【0077】

20 【発明の効果】臍帯血は採取量が限られているため、40kg以下の個体には移植が困難であるなど、実際に臍帯血幹細胞移植が骨髓移植に代わりうる様になるためには解決すべき点は多かった。しかしながら、本発明の方法を用いれば、大量のヒトCD34陽性細胞 (特にCD34<sup>pos</sup>CD38<sup>low</sup>細胞) を短期間の培養により簡便に製造することが可能であることから、任意の成人患者にも移植できる上に、数回にわたる継続投与が可能となる。臍帯血を一度採取しておけば必要ときに必要な量だけ造血幹細胞を供給することができる。また本発明によれば、30 骨髓移植においても大量の骨髓細胞を必要とせず、しかも骨髓の採取に伴うドナーの心身の負担や安全性の問題などを回避することができる。また、造血幹細胞を自己増殖させることにより、急性白血病をはじめとする腫瘍性疾患や重症免疫不全、先天性酵素異常症、再生不良性貧血などの疾患に対処し必要最小限の造血幹細胞の採取で治療できると共に、出産に伴って世界中で廃棄されている臍帯血を有効に活用し、幅広い移植抗原を有する造血幹細胞を保有することによって移植抗原の適合する移植を可能とするため重症の急性移植片対宿主病 (GVHD) のリスクを極めて軽減することができる。臍帯血幹細胞を保存する場合、本発明を用いれば、効率的な保存が可能であると共に、保存量の大幅な減少につながり、また一度採取した血液を登録しておくことでより効率的な造血幹細胞バンクを構築することができる。さらに、増殖した細胞を凍結保存などの長期保存を行うことにより、必要ときに必要とされる移植抗原を有するCD34陽性細胞を素早く使用することができる。さらに、本発明の細胞培養器具を用いれば、所望の細胞 (具体的にはCD34陽性細胞) と第2の細胞 (具体的にはストローマ細胞) とが互いに異種動物であったり (例えばストロー

マ細胞がマウス由来の細胞でCD34陽性細胞がヒト由来の細胞である場合)、違う個体から採取した細胞であっても、互いの細胞を分離・精製することが極めて容易にできるため、ヒトCD34陽性細胞の移植を素早くかつ安全に行うことができる。

【0078】

【図面の簡単な説明】

【図1】造血幹細胞（多能性造血幹細胞）から血液中の血球細胞（T細胞、B細胞、赤血球、血小板、好酸球、単球、好中球、好塩基球）に分化・成熟していく過程を示した図。

【図2】ストローマ細胞とCD34陽性細胞が培地（培養液）中で直接接触し、CD34陽性細胞を増殖させる方法を示した図。

【図3】ストローマ細胞とCD34陽性細胞を膜で隔て、互いの細胞が直接接触していない状態でCD34陽性細胞を増殖させる方法を示した図。（a）は支持膜が1層の場合であり、（b）は支持膜が2層の場合であり、（c）は支持膜を支持具で支えた状態であり、（d）は支持膜を支持台で支えた状態を示している。

【図4】所望の細胞と第2の細胞、具体的にはCD34陽性細胞とストローマ細胞を膜で隔て、互いの細胞が通じ混じり合うことはない状態で培養する方法を示した図。

（a）は支持膜が1層の場合であり、（b）は支持膜が2層の場合であり、かつ一方の支持膜と所望の細胞は離れた状態であり、（c）は支持膜が2層の場合であり、かつ所望の細胞が両支持膜に接触している状態を示している。

【図5】臍帯血より分離したCD34陽性細胞のSSCとFSCによる血球細胞の分布を示した図。

【図6】臍帯血より分離したCD34陽性細胞のFITC標識抗CD34抗体とPE標識抗CD33抗体による血球細胞の分布を示した図。

【図7】ストローマ細胞の非存在下、サイトカイン（rh-IL-3及びrh-SCF）の存在下で10日間培養した後のSSCとFSCによる血球細胞の分布を示した図。

【図8】ストローマ細胞の非存在下、サイトカイン（rh-IL-3及びrh-SCF）の存在下で10日間培養した後のFITC標識抗CD34抗体とPE標識抗CD33抗体による血球細胞の分布を示した図。

【図9】ハイドロコロルチソンの存在下または非存在下、かつサイトカインの存在下または非存在下で増殖する全血球細胞数を示した図。

【図10】ハイドロコロルチソンの存在下または非存在下、かつサイトカインの存在下または非存在下で増殖するCD34陽性細胞数を示した図。

【図11】rh-SCF及びrh-IL-3の存在下、HESS-5の存在下または非存在下における、投入細胞数の違いによる全血球細胞数の増加倍率を示した図。

【図12】rh-SCF及びrh-IL-3の存在下、HESS-5の存在

下または非存在下における、投入細胞数の違いによるCD34陽性細胞の増加倍率を示した図。

【図13】ストローマ細胞の存在下または非存在下で培養することによるHFP-CFC（直径2.5mm以上）のコロニー数の増加を示した図。

【図14】ストローマ細胞の存在下または非存在下で培養することによるHFP-CFC（直径1.0mm以上2.5mm未満）のコロニー数の増加を示した図。

【図15】ストローマ細胞の存在下または非存在下で培養することによるCFU-GMのコロニー数の増加を示した図。

【図16】ストローマ細胞の存在下または非存在下で培養することによるBFU-E及びCFU-GEMコロニーからなる赤芽球系のコロニー数の増加を示した図。

【図17】ストローマ細胞（HESS-5）の存在下、サイトカイン（rh-IL-3及びrh-SCF）の存在下で10日間培養した後のSSCとFSCによる血球細胞の分布を示した図。

【図18】ストローマ細胞（HESS-5）の存在下、サイトカイン（rh-IL-3及びrh-SCF）の存在下で10日間培養した後のFITC標識抗CD34抗体とPE標識抗CD33抗体による血球細胞の分布を示した図。

【図19】ストローマ細胞（HESS-5）の存在下、サイトカインの非存在下で10日間培養した後のSSCとFSCによる血球細胞の分布を示した図。

【図20】ストローマ細胞（HESS-5）の存在下、サイトカインの非存在下で10日間培養した後のFITC標識抗CD34抗体とPE標識抗CD33抗体による血球細胞の分布を示した図。

【図21】臍帯血より分離したCD34陽性細胞のSSCとFSCによる血球細胞の分布を示した図。

【図22】ストローマ細胞（HESS-5）の存在下、サイトカイン（rh-IL-3及びrh-SCF）の存在下でin vitro培養し増殖した細胞から再分離したCD34陽性細胞のSSCとFSCによる血球細胞の分布を示した図。

【図23】臍帯血より分離したCD34陽性細胞のFITC標識した抗CD34抗体とPE標識した抗CD33抗体によるCD34陽性細胞の分布を示した図。

【図24】ストローマ細胞（HESS-5）の存在下、サイトカイン（rh-IL-3及びrh-SCF）の存在下でin vitro培養し増殖した細胞から再分離したCD34陽性細胞のFITC標識抗CD34抗体とPE標識抗CD33抗体によるCD34陽性細胞の分布を示した図。

【図25】臍帯血より分離したCD34陽性細胞のFITC標識抗CD34抗体とPE標識抗CD38抗体によるCD34陽性細胞の分布を示した図。

【図26】ストローマ細胞（HESS-5）の存在下、サイトカイン（rh-IL-3及びrh-SCF）の存在下でin vitro培養し、増殖した細胞から再分離したCD34陽性細胞のFITC標識した抗CD34抗体とPE標識した抗CD38抗体によるCD34陽性細胞の分布を示した図。

【図27】臍帯血より分離したCD34陽性細胞のFITC標識抗CD34抗体とPE標識抗CD13抗体によるCD34陽性細胞の分布を示した図。

【図28】ストローマ細胞 (HESS-5) の存在下、サイトカイン (rh-IL-3及びrh-SCF) の存在下でin vitro培養し増殖した細胞から再分離したCD34陽性細胞のFITC標識抗CD34抗体とPE標識抗CD13抗体によるCD34陽性細胞の分布を示した図。

【図29】臍帯血より分離したCD34陽性細胞の細胞周期を示した図。

【図30】ストローマ細胞 (HESS-5) の存在下、サイトカイン (rh-IL-3及びrh-SCF) の存在下で10日間培養した後、再分離したCD34陽性細胞の細胞周期を示した図。

【図31】ストローマ細胞を膜に接着させ、CD34陽性細胞を膜に接着または非接着させることによる培養方法下の全血球細胞の増加を示した図。

【図32】ストローマ細胞を膜に接着させ、CD34陽性細胞を膜に接着または非接着させることによる培養方法下のCD34陽性細胞の増加を示した図。

【図33】細胞を培養するための器具の構成を例示的に示す図。

【図34】ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞を含む細胞群の特性を示す図。分図 (a) は細胞の形態及び細胞密度を示し、縦軸 (SSC) は細胞密度を示し、横軸 (FSC) は、細胞の大きさを示す。分図 (b) は細胞表面分化抗原CD34及びCD38の発現状態を示し、縦軸はCD38の発現状態を示し、横軸はCD34の発現状態を示す。4分割された各々領域に記載された数値は、該領域内に分布する細胞の総細胞数に対する百分率を示す。

【図35】ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞を、ストローマ細胞の非存在下で培養して得られる全造血幹細胞群の特性を示す図。分図 (a) は細胞の形態及び細胞密度を示し、縦軸 (SSC) は細胞密度を示し、横軸 (FSC) は、細胞の大きさを示す。分図 (b) は細胞表面分化抗原CD34及びCD38の発現状態を示し、縦軸はCD38の発現状態を示し、横軸はCD34の発現状態を示す。4分割された各々領域に記載された数値は、該領域内に分布する細胞の総細胞数に対する百分率を示す。

【図36】ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞を、ストローマ細胞株HESS-5の共存下で培養して得られる全造血幹細胞群の特性を示す図。分図 (a) は細胞の形態及び細胞密度を示し、縦軸 (SSC) は細胞密度を示し、横軸 (FSC) は、細胞の大きさを示す。分図 (b) は細胞表面分化抗原CD34及びCD38の発現状態を示し、縦軸はCD38の発現状態を示し、横軸はCD34の発現状態を示す。4分割された各々領域に記載された数値は、該領域内に分布する細胞の総細胞数に対する百分率を示す。

【図37】ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞を、ストローマ細胞株HESS-18の共存下で培養して得られる全造血幹細胞

細胞群の特性を示す図。分図 (a) は細胞の形態及び細胞密度を示し、縦軸 (SSC) は細胞密度を示し、横軸 (FSC) は、細胞の大きさを示す。分図 (b) は細胞表面分化抗原CD34及びCD38の発現状態を示し、縦軸はCD38の発現状態を示し、横軸はCD34の発現状態を示す。4分割された各々領域に記載された数値は、該領域内に分布する細胞の総細胞数に対する百分率を示す。

【図38】ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞を、ストローマ細胞株HESS-M12の共存下で培養して得られる全造血幹細胞群の特性を示す図。分図 (a) は細胞の形態及び細胞密度を示し、縦軸 (SSC) は細胞密度を示し、横軸 (FSC) は、細胞の大きさを示す。分図 (b) は細胞表面分化抗原CD34及びCD38の発現状態を示し、縦軸はCD38の発現状態を示し、横軸はCD34の発現状態を示す。4分割された各々領域に記載された数値は、該領域内に分布する細胞の総細胞数に対する百分率を示す。

【図39】ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞を、ストローマ細胞株HESS-M28の共存下で培養して得られる全造血幹細胞群の特性を示す図。分図 (a) は細胞の形態及び細胞密度を示し、縦軸 (SSC) は細胞密度を示し、横軸 (FSC) は、細胞の大きさを示す。分図 (b) は細胞表面分化抗原CD34及びCD38の発現状態を示し、縦軸はCD38の発現状態を示し、横軸はCD34の発現状態を示す。4分割された各々領域に記載された数値は、該領域内に分布する細胞の総細胞数に対する百分率を示す。

【図40】ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞を、ストローマ細胞株HESS-5の共存下で培養して得られる全造血幹細胞群から単離したCD34陽性細胞の特性を示す図。分図 (a) は細胞の形態及び細胞密度を示し、縦軸 (SSC) は細胞密度を示し、横軸 (FSC) は、細胞の大きさを示す。分図 (b) は細胞表面分化抗原CD34及びCD38の発現状態を示し、縦軸はCD38の発現状態を示し、横軸はCD34の発現状態を示す。4分割された各々領域に記載された数値は、該領域内に分布する細胞の総細胞数に対する百分率を示す。

【図41】ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞を、ストローマ細胞株HESS-18の共存下で培養して得られる造血幹細胞群から単離したCD34陽性細胞の特性を示す図。分図 (a) は細胞の形態及び細胞密度を示し、縦軸 (SSC)

は細胞密度を示し、横軸 (FSC) は、細胞の大きさを示す。分図 (b) は細胞表面分化抗原CD34及びCD38の発現状態を示し、縦軸はCD38の発現状態を示し、横軸はCD34の発現状態を示す。4分割された各々領域に記載された数値は、該領域内に分布する細胞の総細胞数に対する百分率を示す。

【図42】ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞を、ストローマ細胞株HESS-M28の共存下で培養して得られる造血幹細胞群から単離したCD34陽性細胞の特性を示す図。分図 (a) は細胞の形態及び細胞密度を示し、縦軸 (SSC)

は細胞密度を示し、横軸 (FSC) は、細胞の大きさを示す。

CD38の発現状態を示し、縦軸はCD38の発現状態を示し、横軸はCD34の発現状態を示す。4分割された各々領域に記載された数値は、該領域内に分布する細胞の総細胞数に対する百分率を示す。

【図4】ヒト胎嚢血由来CD34陽性細胞をストローマ細胞株HES-5の共存下で培養して得られたCD34陽性細胞群から単離されたCD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞群を、さらにストローマ細胞株HES-5の共存下で培養して得られたCD34<sup>+</sup>陽性造血幹細胞の特性を示す。図(a)は細胞の形態及び細胞密度を示し、縦軸 (SSC) は細胞密度を示し、横軸 (FSC) は、細胞の大きさを示す。図(b)は細胞表面に発現したCD34及びCD38の発現状態を示し、縦軸はCD38の発現状態を示し、横軸はCD34の発現状態を示す。4分割された各々領域に数値とされた数値は、該領域内に分布する細胞の総細胞数に対する百分率を示す。

【図 49】ヒト脐帯血由来CD34陽性細胞をストローマ細胞株HES-1の共存下で培養して得られたCD34陽性細胞群から単離されたCD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞群を、さらにストローマ細胞株HES-5の共存下で培養して得られたCD34陽性造血幹細胞の特性を示す図。図(a)は細胞の形態及び細胞密度を示し、縦軸(SSC)は細胞密度を示し、横軸(FSC)は、細胞の大きさを示す。図(b)は細胞表面に分布するCD34及びCD38の発現状態を示し、縦軸はCD38の発現状態を示し、横軸はCD34の発現状態を示す。4分割された各々領域に数値された数値は、該領域内に分布する細胞の総細胞数に対する百分率を示す。

【図50】ヒト脐帯血由来CD34陽性細胞をストローマ細胞株HES-28の共存下で培養して得られたCD34陽性細胞群から単離されたCD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞群を、さらにストローマ細胞株HES-5の共存下で培養して得られたCD34陽性若年細胞群の特性を示す図。図(a)は細胞の形態及び細胞密度を示し、縦軸(SSC)は細胞密度を示し、横軸(FSC)は、細胞の大きさを示す。図(b)は細胞表面成分CD34及びCD38の発現状態を示し、縦軸はCD38の発現状態を示し、横軸はCD34の発現状態を示す。4分割された各々領域に記載された数値は、該領域内に分布する細胞の総細胞数に対する百分率を示す。

【図51】ヒト脐帯血由来CD34陽性細胞群から単離したCD34<sup>high</sup>CD38<sup>low</sup>細胞群を、マストローマ細胞系H9cS5と共培養して得られたB細胞前駆細胞の特性を示す図。図分(a)は細胞の形態及び細胞密度を示し、縦軸(SSC)は細胞密度を示し、横軸(FSC)は、細胞の大きさを示す。図分(b)は細胞表面発現抗原CD10及びCD19の発現状態を示し、縦軸はCD10の発現状態を示し、横軸はCD19の発現状態を示す。4分割された各々領域に記載された数値は、該領域内に分布する細胞の総細胞数に対する百分率を示す。

【図52】ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞をストローマ細胞株HESS-5の共存下で培養して得られたCD34陽性細胞群から単離されたCD34<sup>high</sup>CD38<sup>low</sup>細胞群を、さらに

トロマ細胞株HES-5の共存下で培養して得られたB前駆細胞の特性を示す図。分図(a)は細胞の形態及び細胞密度を示し、縦軸(SSC)は細胞密度を示し、横軸(FSC)は、細胞の大きさを示す。分図(b)は細胞表面分化抗原CD10及びCD19の発現状態を示し、縦軸はCD10の発現状態を示し、横軸はCD19の発現状態を示す。4分割された各々領域に記載された数値は、該領域内に分布する細胞の総細胞数に対する百分率を示す。

【図53】ヒト脾臓血由来CD34陽性細胞をストローマ細胞株HES-18の共存下で培養して得られたCD34陽性細胞群から単離されたCD34<sup>high</sup>CD38<sup>low</sup>細胞群を、さらにストローマ細胞株HES-5の共存下で培養して得られたB前駆細胞の特性を示す図。分図(a)は細胞の形態及び細胞密度を示し、縦軸(SSC)は細胞密度を示し、横軸(FSC)は、細胞の大きさを示す。分図(b)は細胞表 \*

【図2】

図 2

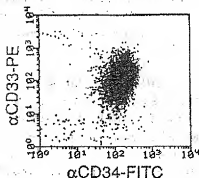
CD34陽性細胞の培養例(接液培養)



【図6】

図 6

脾臓血由来CD34陽性細胞の分布



\* 面分化抗原CD10及びCD19の発現状態を示し、縦軸はCD10の発現状態を示し、横軸はCD19の発現状態を示す。4分割された各々領域に記載された数値は、該領域内に分布する細胞の総細胞数に対する百分率を示す。

【図54】ヒト脾臓血由来CD34陽性細胞をストローマ細胞株HES-M28の共存下で培養して得られたCD34陽性細胞群から単離されたCD34<sup>high</sup>CD38<sup>low</sup>細胞群を、さらにストローマ細胞株HES-5の共存下で培養して得られたB前駆細胞の特性を示す図。分図(a)は細胞の形態及び細胞密度を示し、縦軸(SSC)は細胞密度を示し、横軸(FSC)は、細胞の大きさを示す。分図(b)は細胞表面分化抗原CD10及びCD19の発現状態を示し、縦軸はCD10の発現状態を示し、横軸はCD19の発現状態を示す。4分割された各々領域に記載された数値は、該領域内に分布する細胞の総細胞数に対する百分率を示す。

【図5】

図 5

脾臓血由来CD34陽性細胞の分布

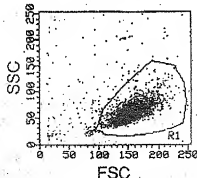
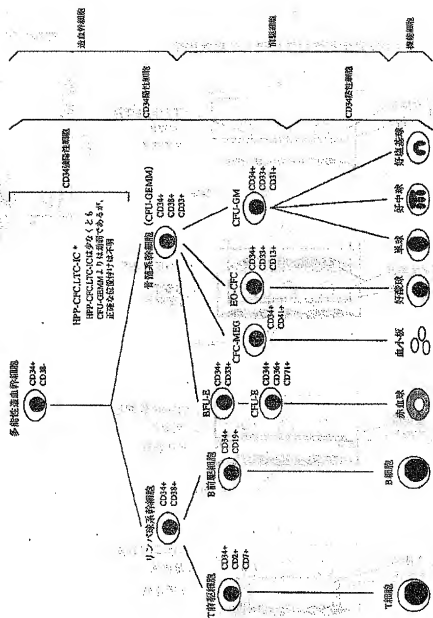


図 1  
血液細胞の分化の模式図

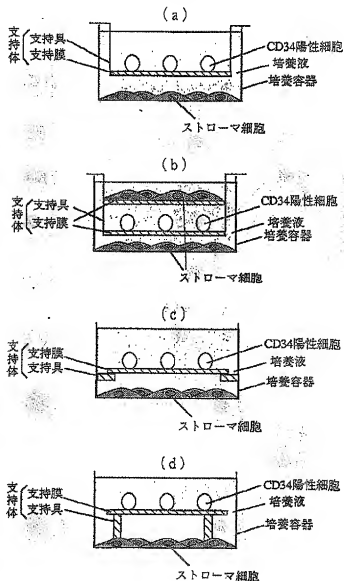




【図3】

図 3

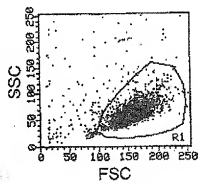
CD34陽性細胞の培養例（非接触培養）



【図21】

図 21

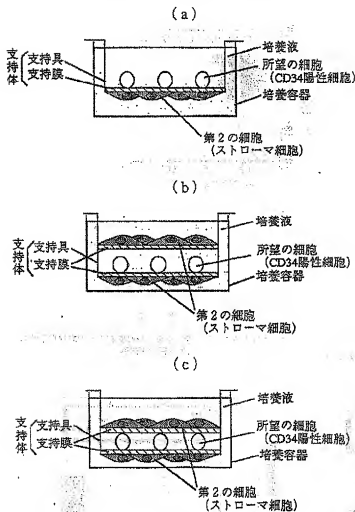
脐帯血由来CD34陽性細胞の分布



【図4】

図 4

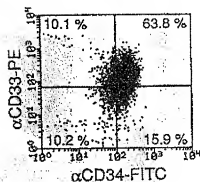
CD34陽性細胞の培養例（間接接触培養）



【図23】

図 23

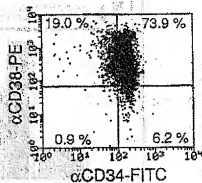
脐帯血由来CD34陽性細胞の分布



【図25】

図 25

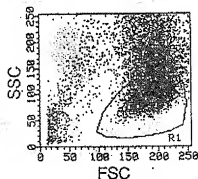
脐帯血由来CD34陽性細胞の分布



【図7】

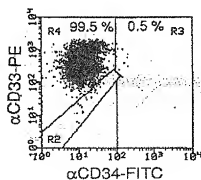
図 7

ストローマ細胞の非存在下、サイトカインの存在下での ストローマ細胞の非存在下、サイトカインの存在下での  
CD34陽性細胞の分布 CD34陽性細胞の分布



【図8】

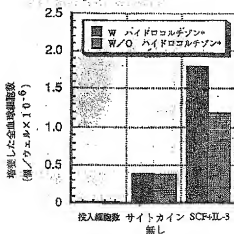
図 8



【図9】

図 9

ハイドロコルチゾン、サイトカインの存在下又は非存在下での  
全血球細胞数

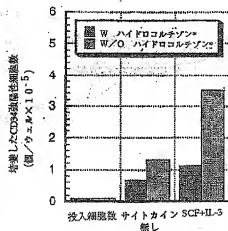


W ハイドロコルチゾンはハイドロコルチゾン存在下、  
W/Oハイドロコルチゾンはハイドロコルチゾン非存在下を意味する。

【図10】

図 10

ハイドロコルチゾン、サイトカインの存在下又は非存在下での  
CD34陽性細胞数

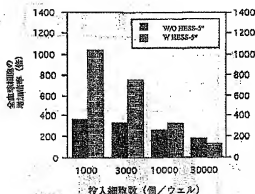


W ハイドロコルチゾンはハイドロコルチゾン存在下、  
W/Oハイドロコルチゾンはハイドロコルチゾン非存在下を意味する。

【図11】

図 11

サイトカイン存在下におけるHES5細胞の存在下又は非存在下での サイトカイン存在下におけるHES5細胞の存在下又は非存在下での  
全血球細胞の増加倍率

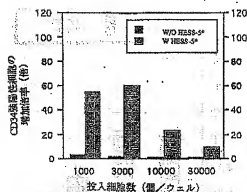


\* WO HES5-5はHES5細胞存在下であり、  
W HES5-5はHES5細胞存在下を示す。

【図12】

図 12

CD34陽性細胞の増加倍率

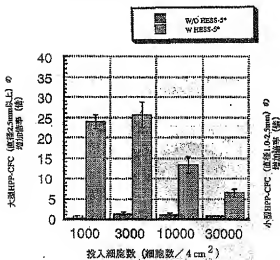


\* WO HES5-5はHES5細胞存在下であり、  
W HES5-5はHES5細胞存在下を示す。

【図13】

図 13

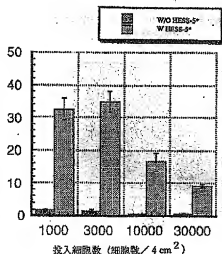
HES5細胞の存在下又は非存在下での  
大型HPP-CFCコロニーの増加倍率



【図14】

図 14

HES5細胞の存在下又は非存在下での  
小型HPP-CFCコロニーの増加倍率

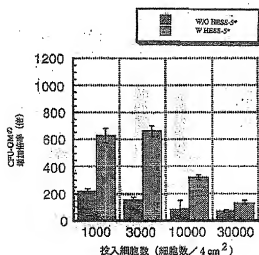


\* WO HES5-5はHES5細胞存在下であり、  
W HES5-5はHES5細胞存在下を示す。

【図15】

図 15

HES5-5細胞の存在下又は非存在下での  
CFU-GMコロニーの増加倍率

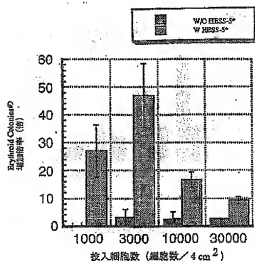


\*WO HES5-5はHES5-5細胞非存在下であり、  
W HES5-5はHES5-5細胞存在下を示す。

【図16】

図 16

HES5-5細胞の存在下又は非存在下での  
赤血球系細胞コロニーの増加倍率

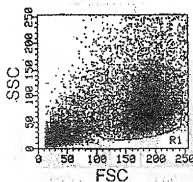


\*WO HES5-5はHES5-5細胞非存在下であり、  
W HES5-5はHES5-5細胞存在下を示す。

【図17】

図 17

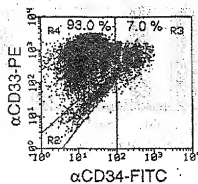
ストローマ細胞の存在下、サイトカインの存在下での  
血液細胞の分布



【図18】

図 18

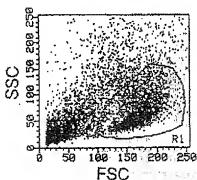
ストローマ細胞の存在下、サイトカインの存在下での  
血液細胞の分布



【図19】

図 19

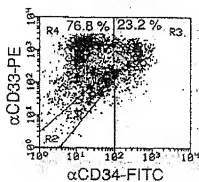
ストローマ細胞の存在下、サイトカインの非存在下での  
血液細胞の分布



【図20】

図 20

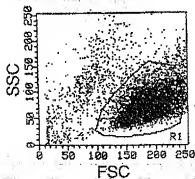
ストローマ細胞の存在下、サイトカインの非存在下での  
血液細胞の分布



【図22】

図 22

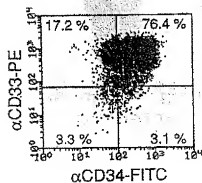
HES5-5細胞の存在下、サイトカインの存在下で再分離した  
血液細胞の分布



【図24】

図 24

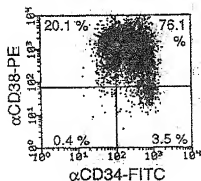
HES5-5細胞の存在下、サイトカインの存在下で再分離した  
血液細胞の分布



【図26】

図 26

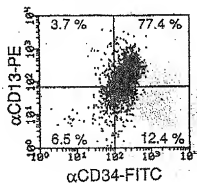
HBSS-5細胞の存在下、サイトカインの存在下で再分離した  
血液細胞の分布



【図27】

図 27

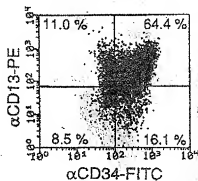
臍帯血由来CD34陽性細胞の分布



【図28】

図 28

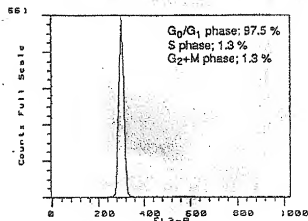
HBSS-5細胞の存在下、サイトカインの存在下で再分離した  
血液細胞の分布



【図29】

図 29

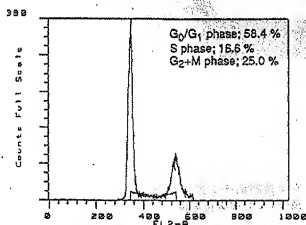
臍帯血由来CD34陽性細胞の細胞周期



【図30】

図 30

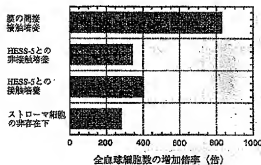
HESS-5細胞の存在下、サイトカインの存在下で再分離した  
CD34陽性細胞の細胞周期



【図31】

図 31

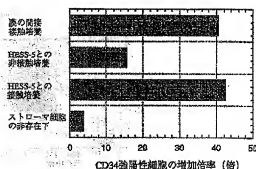
間接接合培養法、非接合培養法、接合培養法及びストローマ細胞  
の非存在下での全血球細胞の増加倍率



【図32】

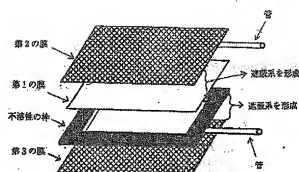
図 32

間接接合培養法、非接合培養法、接合培養法及びストローマ細胞  
の非存在下でのCD34陽性細胞の増加倍率



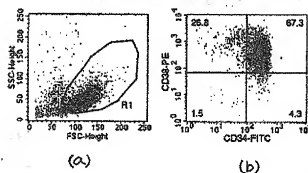


【図33】



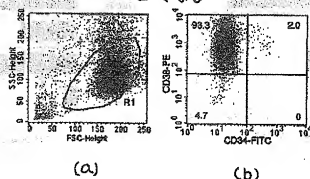
【図34】

ヒト臍帯血から取得した  
新鮮なCD34陽性細胞



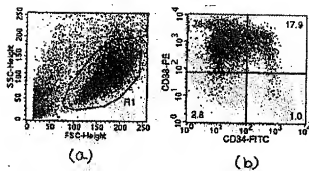
【図35】

ストローマなし



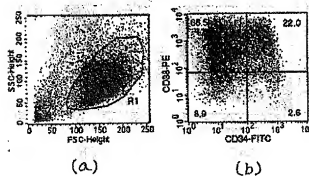
【図36】

HES-5 cells



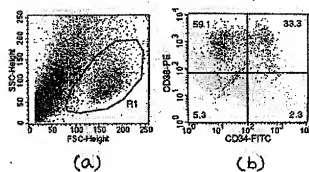
【図37】

HES-18 cells



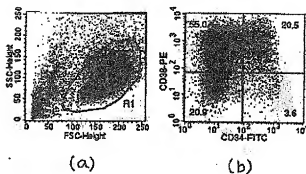
【図38】

HENS-M12 cells



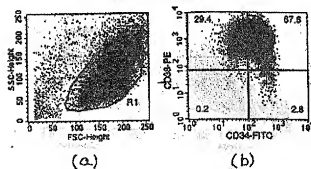
【図39】

## HESS-M28 cells



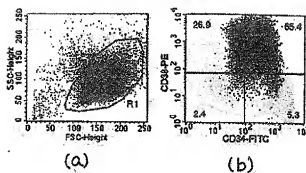
【図40】

## HESS-5 cells



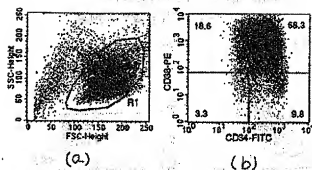
【図41】

## HESS-18 cells



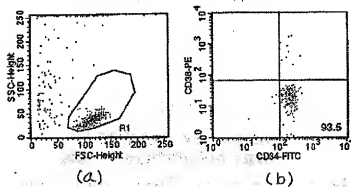
【図42】

HESS-M28 cells



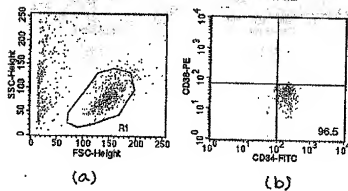
【図43】

ヒト臍帯血から取得した  
新鮮な  $CD34^{high}CD38^{low/-}$  細胞



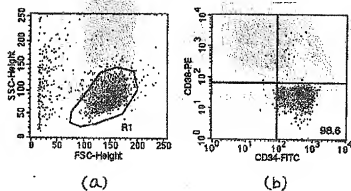
【図44】

HESS-5との一次共培養系から  
単離した  $CD34^{high}CD38^{low/-}$  細胞



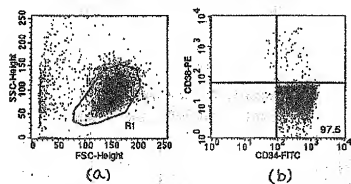
【図45】

HESS-18との一次共培養系から  
単離したCD34<sup>high</sup>CD38<sup>low</sup>細胞



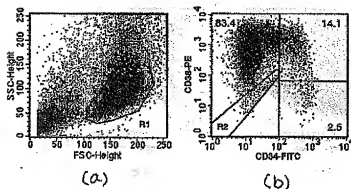
【図46】

HESS-M28との一次共培養系から  
単離したCD34<sup>high</sup>CD38<sup>low</sup>細胞



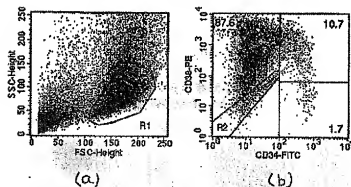
【図47】

ヒト臍帯血から取得した  
新鮮なCD34<sup>high</sup>CD38<sup>low</sup>細胞



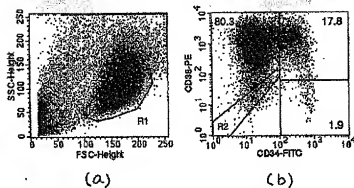
【図48】

HESS-5との一次共培養系から  
単離したCD34<sup>high</sup>CD38<sup>low</sup>細胞



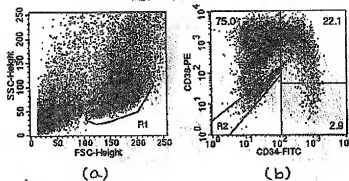
【図49】

HESS-18との一次共培養系から  
単離したCD34<sup>high</sup>CD38<sup>low</sup>細胞



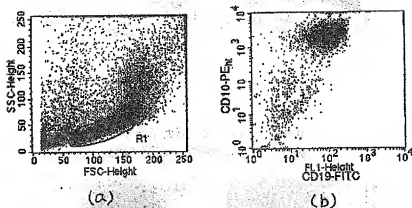
【図50】

HESS-M28との一次共培養系から  
単離したCD34<sup>high</sup>CD38<sup>low</sup>細胞



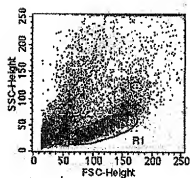
【図51】

ヒト臍帯血から単離した  
新鮮なCD34陽性細胞

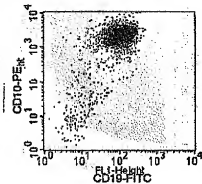


【図52】

HESS-5との一次培養系から

単離した $CD34^{high}CD38^{low}$ 細胞

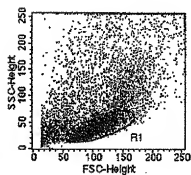
(a)



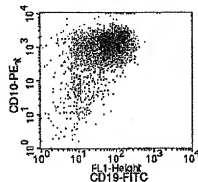
(b)

【図53】

HESS-18との一次培養系から

単離した $CD34^{high}CD38^{low}$ 細胞

(a)

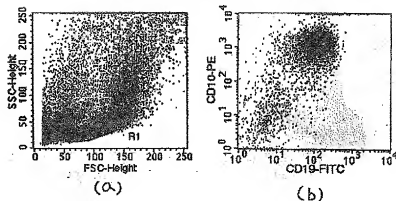


(b)



【図54】

HESS-M28との一次共培養系から  
単離したCD34<sup>high+</sup>CD38<sup>low/-</sup>細胞



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

A 61 K 35/50

C 12 M 3/00

// (C 12 N 5/06

C 12 R 1:91)

識別記号

F I

A 61 K 35/50

C 12 M 3/00

A